

DIE REAKTION VON DIAZONIUM-
SALZEN MIT AMINOSÄUREN
UND PEPTIDEN

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Vorgelegt von
Peter Veerhoff
Frankfurt am Main

1962



Gedruckt mit Genehmigung der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Frankfurt am Main

Dekan: Herr Professor Dr.Egle

1.Berichterstatter: Herr Professor Dr.Pfleiderer

2.Berichterstatter: Herr Professor Dr.Th.Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 12.7.1962

Tag der Promotion: 30.7.1962

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Gerhard Pfeleiderer im Institut für Organische Chemie in Frankfurt am Main in der Zeit vom September 1960 bis März 1962 ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Pfeleiderer, möchte ich für die Überlassung des Themas und seine persönliche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit herzlich danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich an dieser Stelle für die Förderung meiner Arbeit durch die Gewährung eines Stipendiums meinen Dank aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

A.	<u>Allgemeiner Teil</u>	Seite
I.	Methoden und Ergebnisse der Protein-Strukturanalyse	1
	1.) Totalaufklärung von Proteinen	1
	2.) Spezielle Arbeitsprobleme	2
II.	Das Spezialproblem der aktiven Sequenz	2
	1.) Begriffserläuterung an Hand der bisherigen Arbeitsergebnisse	2
	2.) Strengere Definition des aktiven Zentrums	5
	3.) Methoden zur Aufklärung des aktiven Zentrums	6
	4.) Variationsmöglichkeiten der allgemeinen Arbeitsweise und neue Reagentien	11
III.	Grundlagen und Ziel der Arbeit	16
B.	<u>Spezieller Teil</u>	
I.	Reaktion von Diazoniumsalzen mit Aminosäuren	18
	1.) Bisherige Arbeiten	18
	2.) Eigenzerfall des diaz. p-Nitranilins	22
	3.) Reaktion mit Tyrosin-, Histidin und Lysin-Derivaten (Spektren)	23
	4.) Darstellung der Farbstoffe der "Hauptkuppler"	26
	5.) Hydrolyse dieser Farbstoffe	28
	6.) Versuche mit anderen Aminosäuren	29
	7.) Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse	32
II.	Reaktion von Diazoniumsalzen mit Proteinen	33
	1.) Reaktion mit Ribonuklease	33
	a) Hemmkurven	34
	b) Quantitative Bestimmung der gekuppelten Aminosäuren nach 3 verschiedenen Verfahren	38
	2.) Reaktion mit LDH aus Schweineherz	45
	a) Hemmkurve der ungeschützten LDH	45
	b) Schutz der SH-Gruppen mit PCLMS	47
	c) Hemmkurve geschützter LDH	50

3.)	Anwendung von radioaktiver diazotierter Sul-	
	fanilsäure bei der Reaktion mit LDH	51
a)	Messung der Einbaurate	51
b)	Verdauungsversuche	52
c)	Reinigung des mit Trypsin gewonnenen Peptid-	
	gemischs	55
d)	Ermittlung der Brutto-Aminosäurezusammen-	
	setzung der isolierten markierten Peptide	58
4.)	Zusammenfassung der Ergebnisse der Arbeit	61
C.	<u>Experimenteller Teil</u> (Material u.Methoden)	
I.	Zur Reaktion mit Aminosäuren	63
1.)	Darstellung der Diazoniumsalze	63
2.)	Aufnahme der Spektren	64
3.)	Darstellung der Farbstoffe	64
4.)	Zusammenfassende Tabellen der Maxima, R_F -Wer-	
	te , sowie Lösungsmittelgemische u.Puffer	67
5.)	Kupplung und Hydrolyse der Insulin-B-Kette	69
II.	Zur Reaktion mit Proteinen	
1.)	Ribonuklease-Test	69
2.)	Histidinbestimmung nach NEWMAN und TURNBULL	70
3.)	Modifiziertes Biuretverfahren f.Azoproteine	70
4.)	SH-Bestimmung nach BOYER	71
5.)	Kupplung geschützter LDH	72
6.)	Proteolytischer Abbau mit Trypsin	73
7.)	Radioaktivitäts-Messungen	74
8.)	Autoradiographie	75

A. Allgemeiner Teil

I. Methoden und Ergebnisse der Protein-Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung von Proteinen ist bisher im Vergleich zu anderen Gebieten der Naturstoff-Strukturaufklärung ein relativ "unterentwickelter" Zweig der Chemie geblieben. Das hat wohl hauptsächlich seinen Grund darin, daß dieses Gebiet mit großen, ganz spezifischen Schwierigkeiten zu kämpfen hat, die in den anderen Gebieten nicht auftreten. Zu nennen ist hier hauptsächlich die Denaturierung der Proteine schon durch relativ milde chemische Agentien und physikalische Einwirkungen, und ihre größtenteils makromolekulare Natur in Verbindung mit der Tatsache, daß sie nicht, wie andere hochpolymere Substanzen, aus gleichen, sondern aus 18 - 20 verschiedenen, bisher ohne jede erkannte Regel miteinander abwechselnden Bausteinen sehr unterschiedlicher Reaktivität bestehen. Daher rührt es, daß Totalaufklärungen von Eiweißmolekülen erst in jüngster Zeit erfolgreich waren (SANGERS Insulinaufklärung ¹⁾, und die Arbeiten der Gruppen ANFENSEN und REDFIELD, sowie HIRS, MOORE und STEIN ²⁾ über die Ribonuklease) und auch jetzt nur vereinzelt bei relativ kleinen Molekülen in Angriff genommen werden. (Arbeiten über Lysozym ³⁾ und das Papain ⁴⁾ sind im Gange). Arbeiten solcher Art haben auch noch zu keiner allgemeingültigen Methode geführt, wenn auch die von SANGER verwandten enzymatischen und chemischen Methoden, sowie die Peptidtrennungen und die automatische Aminosäureanalyse, die im Zuge der Ribonuklease-Totalaufklärung entwickelt wurden, wichtige methodische Hilfsmittel bei zukünftigen derartigen Arbeiten sein werden.

Dieser wohl im Augenblick interessanteste Zweig der organischen Naturstoffchemie hat sich daher bisher zum größten Teil auf Teilprobleme und Teillösungen beschränken müssen.

Einerseits ist man vorläufig dazu übergegangen, als Objekte für Studien an Proteinen höheren Molekulargewichts Enzyme zu wählen, da hier der Angriff chemischer Agentien durch Verfolgung des Aktivitätsverlaufs während der Reaktion kontrolliert werden kann, zum andern hat man sich auch hier zumeist auf die Kenntnis bestimmter Teilsequenzen beschränkt. Zu erwähnen ist hier einmal die sogenannte "vergleichende Sequenzanalyse", die sich hauptsächlich mit der Ermittlung und dem Vergleich der C- und N-terminalen Sequenz von Proteinen gleicher Funktion, aber verschiedener Herkunft befaßt, und deren Ergebnisse vielleicht einmal mehr Licht in die genetischen und evolutionären Zusammenhänge und in das Wesen des Mutationsprozesses bringen werden. Wichtige Arbeiten auf diesem Gebiet sind Studien über das Tabakmosaikvirusprotein ⁵⁾ sowie über Serumalbumine verschiedener Herkunft ⁶⁾. Ein wichtiges Begleitergebnis der Endgruppenanalyse mit enzymatischen Methoden war die Erkenntnis, daß offenbar nicht alle Aminosäuren des Proteinverbandes für die Erhaltung der Aktivität im gleichen Maße notwendig sind. Sie führte zur Formulierung der sogenannten "junk-hypothesis", wonach die Enzymaktivität mit einem bestimmten "Bereich" (site) verknüpft ist, zu dessen Vollständigkeit ein größerer oder kleinerer Teil des Moleküls unwesentlich und entbehrlich ist.

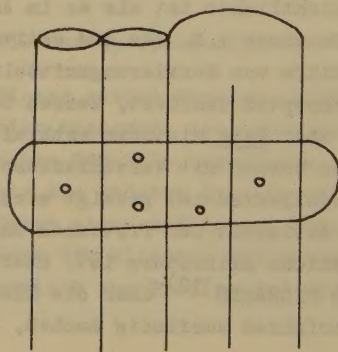
II. Das Spezialproblem der aktiven Sequenz

Dieser aktive Bereich (active site), dessen Existenz wir hier begegnen, ist offenbar eine Teilsequenz der Enzyme, deren Kenntnis wesentlich interessanter und wichtiger ist als die anderer Peptidsequenzen des gleichen Moleküls. Durch seine Aufklärung kann man Einblick erhoffen in einige der ältesten und brennendsten biochemischen Fragen, nämlich das Problem der unvergleichlichen Substratspezi-

fität der Enzyme, die bisher immer noch der jedes von Menschenhand hergestellten Katalysators überlegen ist; sowie dem Mechanismus der Substrat-Aktivierung, der ja noch weitgehend rätselhaft ist. Denn an seiner Oberfläche spielt sich die Bildung des Enzym-Substratkomplexes ab, die nach heutiger Ansicht die wichtigste Stufe der Substratreaktion darstellt. Die Aufklärung der aktiven Zentren von Enzymen ist denn auch von vielen Arbeitskreisen und mit mannigfachen Methoden in Angriff genommen worden und hat schon schöne Erfolge gezeitigt; zum Beispiel die Aufklärung der aktiven Zentren von sechs verschiedenen Esterasen (Chymotrypsin, Trypsin, Thrombin, Elastase, Ali-Esterase und Cholinesterase), die alle die gleiche Peptidsequenz -Gly-Asp-Ser-Gly- enthalten ⁷⁾ und bei denen daher auf weitgehend gleichen Reaktionsmechanismus geschlossen werden darf; weiter die Hämoglobin- und Cytochromsequenzen in der Umgebung des Porphyrinrestes, die beweisen, daß zumindest ein Histidin an der Bindung des funktionellen Eisens beteiligt sein muß ⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾, und Untersuchungen über die Ribonuklease, für deren Aktivität ein dem Carboxylende nahes Zentrum verantwortlich gemacht wird. ¹¹⁾

Gerade durch die genannten Arbeiten aber erwies sich, daß (wie schon so oft in der Proteinchemie) auch dieses Problem wesentlich unübersichtlicher ist als es im Anfang den Anschein hatte. So wurde z.B. aus dem aktiven Zentrum des Trypsins mit Hilfe von Markierungsmitteln (siehe unten) ein Pentadeka-peptid isoliert, dessen Sequenz bestimmt wurde, das aber kein Histidin enthielt. Andererseits war aber schon vorher mit verschiedenen Methoden (Photooxydation, Modellversuche) gezeigt worden, daß Histidin eine für die Aktivität der Proteasen Chymotrypsin und Trypsin wesentliche Aminosäure ist. Hierher gehört auch die Arbeit von RICHARDS ¹²⁾ über die Ribonuklease. Er konnte ein Verfahren ausfindig machen, durch

das mit Hilfe von Subtilisin nur eine Peptidbindung gespalten und so ein Peptid von 20 Aminosäuren abgelöst wird. Die Ribonuklease ist dann inaktiv. Mischt man indes beide Komponenten miteinander, so kehrt die Aktivität zurück. Die Molekülbruchstücke gewinnen, so scheint es, durch zwischenmolekulare Kräfte die gleiche Lage zueinander wie im nativen Molekül. Die Aktivität bleibt jedoch verschwunden nach Photooxydation jedes einzelnen der Bruchstücke. Es muß also neben dem schon lange bekannten carboxylnahen essentiellen Histidin noch eines im Innern der Kette zum aktiven Zentrum gehören (oder zur Aufrechterhaltung von dessen Struktur beitragen.) Außerdem ist seit langem bekannt, daß (viele Enzyme) durch Harnstoff und Guanidin (die Wasserstoffbrücken sprengen) sowie durch Reduktion von -S-S-Brücken zu SH-Gruppen und die dadurch bewirkte Entfaltung des Moleküls zahlreiche Enzyme rasch inaktiviert werden; ebenso die Tatsache, daß Gruppen im Proteinverband oft eine andere Reaktivität zeigen als normalerweise zu erwarten (z.B. die "maskierten" SH-Gruppen). Diese Befunde führten zu dem Bild einer dreidimensionalen Struktur des aktiven Zentrums, dessen verschiedene Aminosäuren einander durch die Faltung der Peptidkette nahegebracht werden und das Dixon in seinem Buch "The Enzymes" ¹³⁾ folgendermaßen dargestellt hat (siehe untenstehende Skizze:)



◀ Aktives Zentrum. Die Punkte stellen die aktiven Aminosäuren dar. (Haftstellen)

◀ Protein Ketten

Darüberhinaus wurde durch die zunehmende Zahl der Arbeiten, die mit Hemm- oder Vergiftungsreagentien an der Markierung des aktiven Bereichs arbeiteten, eine genauere Definition der "zum aktiven Zentrum gehörenden" Aminosäuren immer dringlicher. Diese nimmt D.E. KOSHLAND in seinem kürzlich erschienenen Artikel "The active site and enzyme action" ¹⁴⁾ folgendermaßen vor: er unterscheidet vier Arten von Aminosäuren innerhalb eines Enzyms.

1.) Die Kontaktamino-säuren

Sie haben nur einen Abstand von etwa einer Bindungslänge ($< 2 \text{ \AA}$) vom Substrat und bilden damit die eigentlichen Haft- und Umsatzstellen für es. Sie bilden das aktive Zentrum im engeren und eigentlichen Sinne.

2.) Die "Auxiliary Aminoacids"

Sie spielen eine definierte Rolle bei der enzymatischen Reaktion, obwohl sie nicht im Kontakt mit dem Substrat sind. Sie helfen auch bei der Wiederherstellung der Aktivität nach reversibler Denaturierung; so z.B. das Histidin als Metallchelator oder das Cystein als -S-S- Brückenbildner.

3.) Die "Contributing Aminoacids"

Bei ihnen ist nur die Ladung wichtig. Beispiel KOSHLANDs sind die Lysinreste des Papains: sieben von acht können guanidiert (in Homoarginin überführt) werden, ohne daß die Aktivität leidet. Die größere Raumerfüllung ist also hier bedeutungslos. Andererseits zerstört Diazotierung (Umwandlung in ϵ -hydroxy- α -Aminocapronsäure) die Ladung dieser Aminosäure, und damit verschwindet auch die Aktivität des Papains. KOSHLAND betrachtet diese Aminosäuren als das "Gerippe, mit dem auxiliary und contact-aminoacids verknüpft sind. Sie spielen keine dynamische Rolle bei der enzymatischen Reaktion und könnten in der Theorie durch ein ähnlich geartetes Grundgerüst ersetzt werden."

4.) Die "Junk Aminoacids"

Dies sind die uns schon von der junk hypothesis her bekannten, für die Enzymaktivität bedeutungslosen Aminosäuren. Sie können aber eventuell von Wichtigkeit für die

Artspezifität des betreffenden Proteins sein. (s.a.¹⁵⁾)

Die Aminosäuren im eigentlichen aktiven Zentrum (nach KOSHLAND höchstens etwa 30 bis 60) dienen folgenden Zwecken bei der enzymatischen Reaktion: erstens, den Substrat-Enzymkomplex durch ihre Hafteigenschaften zu ermöglichen und mit dem Substratmolekül so zu reagieren, daß bestimmte Bindungsumgruppierungen erfolgen können; zweitens, die Spezifität des Enzyms zu bestimmen. Die Aminosäuren, die für die eigentliche Reaktion (Bindungsumgruppierung) erforderlich sind, müssen mit dem Substrat und miteinander eine ganz bestimmte Konstellation bilden. Ob diese zustandekommen kann, bestimmen die Spezifitäts-Aminosäuren. Auf diese Weise kann zwar oft von einer Reihe von Stoffen ein Enzym-Substratkomplex gebildet werden (kompetitive Hemmung) aber bei nur wenigen erfolgt dann Reaktion und Wiederauflösung des Komplexes.

Methoden zur Aufklärung des aktiven Zentrums

Das Problem der Strukturaufklärung von aktiven Zentren ist in den letzten Jahren mit den verschiedensten Methoden in Angriff genommen worden. Eine gern angewandte Methode bei Enzymen, die mit Hilfe eines Coenzyms reagieren (z.B. den Dehydrogenasen) besteht in dessen Abwandlung und der Beobachtung der Reaktivität des Enzyms mit diesem veränderten Coenzym. Daraus können Rückschlüsse auf die Art der bindenden Aminosäuren im ternären Enzym-Coenzym-Substratkomplex bezogen werden. Ein Beispiel für die Ergebnisse dieser Arbeitsmethodik ist die später kurz geschilderte Theorie der Bindung des DPN im Laktatdehydrogenase-Komplex. Untersuchungen dieser Art sind vom Arbeitskreis von KAPLAN¹⁶⁾ und im hiesigen Institut an Dehydrogenasen ausgeführt worden. Ähnliche Ergebnisse er-

bringen oft Abwandlungen des Substrats; d.h. die Untersuchung von kompetitiven Hemmstoffen sowie der Vergleich der Michaelis-Konstanten von Substrat und Hemmstoff. Studien dieser Art lassen Rückschlüsse auf die Größe des aktiven Zentrums sowie die Art der spezifitätsbestimmenden Aminosäuren zu. Auch die Aktivierung der Einlagerung von Ionen in das DPN-Molekül (z.B. Cyanid, Sulfit) gehört zu dieser Art von Untersuchungen, ebenso wie Messungen von Fluoreszenzverschiebungen des Enzym-Substratkomplexes. Als letzte Kategorie der mittelbaren Möglichkeiten, Rückschlüsse auf die Natur des aktiven Zentrums zu ziehen, seien die Modellreaktionen erwähnt. So hat z.B. V. FRANZEN letztlich ¹⁷⁾ die Glyoxalase-Reaktion durch Verwendung von Modellsubstanzen aufklären und das Vorhandensein einer basischen Aminosäure im aktiven Bereich dieses Enzyms wahrscheinlich machen können.

Untersuchungen über die Notwendigkeit von Metallionen für die Aktivität können ebenfalls oft Hinweise geben auf die Notwendigkeit bestimmter Aminosäuren für die Enzym-Aktivität. Ein schönes Beispiel dafür sind die verschiedenen in den letzten zwei Jahren erschienenen Arbeiten über die Carboxypeptidase ¹⁸⁾ ¹⁹⁾ ... bei der Zn^{++} als essentieller Bestandteil des aktiven Moleküls identifiziert werden konnte. In der letzten Arbeit ¹⁹⁾ wurde nachgewiesen, daß das Zn^{++} an den einzigen im Molekül aufzufindenden SH-Rest gebunden ist, dessen essentielle Natur für die Enzymaktivität auf diese Weise außer Zweifel steht. Metallionen können allerdings zwei verschiedene Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Enzymaktivität erfüllen; nämlich 1.) die Tertiärstruktur des Moleküls mit fixieren zu helfen und 2.) (ebenfalls durch ihre Eigenschaft, Metallchelat zu bilden, bedingt) die Bindung zwischen Enzym und Substrat zu vermitteln, d.h. sozusagen als eine Art Coenzym zu reagieren. Die Autoren unterscheiden daher zwischen "Metallkomplex-Enzym" und "Metallo-Enzym". (Die

Carboxypeptidase ist z.B. ein Metallo-Enzym, denn das Enzym hat ohne Zn^{++} die gleiche räumliche Struktur wie vorher, ist aber inaktiv). Während so die Anwesenheit von Metallionen noch nicht immer direkt auf die für die Aktivität wesentlichen Aminosäuren hindeutet, läßt die Abwesenheit von Metallionen vermuten, daß bestimmte starke Chelatbildner (z.B. Histidin) vielleicht keine Rolle in der enzymatischen Reaktion spielen.

Da die p_K -Werte der meisten Aminosäure-Seitenketten beträchtlich differieren, kommt auch der p_K -Messung an Enzymen erhöhte Bedeutung als Hinweis auf aktive Gruppen zu; denn es wurde wiederholt eine p_H -Abhängigkeit wichtiger enzymatischer Eigenschaften (z.B. der Michaelis-Konstanten oder der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit) beobachtet. Aus daraus resultierenden Berechnungen kann sehr oft der p_K einer substratbindenden Seitenkette ermittelt werden. Aus der Säurenatur sehr vieler Substrate in wichtigen Stoffwechselzyklen darf geschlossen werden, daß die Natur die ionische Substratbindung bevorzugt, und für substratbindende Gruppen dieser Art sollte in günstigen Fällen die p_K -Messung eine sehr brauchbare Methode sein. Als Kontrolle und Standard dient dabei der p_K der betreffenden Aminosäure in Oligopeptiden. In Proteinen treten in vereinzelt Fällen Verschiebungen bis zu 2 p_H -Einheiten relativ zum Standard auf, jedoch sind diese in der Regel unbedeutend. Diese Verschiebungen lassen andererseits Schlüsse darauf zu, ob bereits auf andere Weise gefundene Gruppen "maskiert" (d.h. im Innern des Proteins versteckt) sind, ferner auch auf die Nachbarschaft bestimmter, mit ihren p_K -Werten aus dem normalen Rahmen fallender Gruppen. Dies zeigten z.B. sehr schön die Arbeiten von TANFORD ²⁰⁾ ²¹⁾ über die Ribonuklease, der fand, daß drei phenolische OH-Gruppen nicht erfaßbar

waren, sowie aus den p_K -Werten der erfaßten zwei Carboxylseitenketten auf deren Lage neben der doppelt geladenen Lysin-Endgruppe ($2 \text{ NH}_3^{(+)}$ -) beziehungsweise in Position 38 neben je einem einfach positiv geladenen Lysyl- und Arginyl-Rest schloß. Mit Hilfe von p_K -Messungen wurde auch das Vorhandensein von Histidin im aktiven Zentrum der Esterasen bewiesen, das oben bereits erwähnt wurde.

Spezielle Bedeutung für die Aminosäuren Histidin und Tryptophan hat die Methode der Photooxydation mit Hilfe von Methylenblau, die aber voraussetzt, daß das Enzym keine aktiven SH-Gruppen hat. (Diese wären wesentlich einfacher nachzuweisen). Von allgemeiner Wichtigkeit und wohl die am häufigsten angewandte Methode bei der Strukturuntersuchung von aktiven Zentren ist aber das sogenannte "Covalent Labelling", d.h. die Markierung bestimmter Seitenketten mit Hilfe mehr oder weniger spezifischer Reagentien. Als Ideal ist hier die natürliche Markierung des Hämoglobins, der Cytochrome und der Flavo-Enzyme mit kovalent gebundenen Coenzymen, sogenannten "prosthetischen Gruppen" anzusehen. Hier kann durch enzymatischen Abbau und Bestimmung der Sequenz des isolierten Hämopeptids auf (theoretisch) einfache Weise das aktive Zentrum aufgeklärt werden. Dies ist durch die Arbeiten von INGRAM und TUPPY und in neuester Zeit von dem bereits zitierten Arbeitskreis ¹⁰⁾ geschehen. Als methodisch vorbildlich seien auch noch die schon mehrfach zitierten Arbeiten über das aktive Zentrum der sechs Esterasen erwähnt. Hier wurde mit radioaktivem Diisopropylfluorophosphat markiert, das sich nur mit der OH-Gruppe eines Serin-Restes umsetzt. Anschließend wurde ebenfalls proteolytisch gespalten und die Sequenz des isolierten radioaktiven Peptids aufgeklärt. Aus diesen zwei Reihen von Arbeiten geht deutlich die Aufgabenstellung ähnlicher zukünftiger

Arbeiten hervor, nämlich

1. Auffindung eines geeigneten, leicht radioaktiv markierbaren Reagenz'

2. Markierung und Spaltung in geeigneter Weise, so daß wenige markierte Bruchstücke entstehen, die sich leicht reinigen lassen

3. deren Isolierung und Reinigung

4. Sequenzaufklärung der isolierten Peptide.

Es geht ebenfalls daraus hervor, welche Bedingungen ein brauchbares Markierungsreagenz erfüllen sollte, nämlich

1. Reaktion mit möglichst wenigen, wenn möglich nur mit einer einzigen Aminosäure

2. Reaktion unter möglichst schonenden, im Idealfall physiologischen Bedingungen

3. Inaktivierung des Enzyms durch möglichst wenig überschüssiges Reagenz.

In den letzten Jahren sind mehrere hervorragende zusammenfassende Artikel über sämtliche bis etwa 1959 benutzten Reagentien, ihre Spezifität und ihren Anwendungsbereich erschienen ^{22) - 26)}, so daß sie hier nicht im einzelnen aufgezählt und besprochen zu werden brauchen. Es sei nur kurz eine Tabelle der Seitenketten in Proteinen sowie der wichtigsten dafür benutzten Reagentien gegeben:

-SH (Cystein) : Jodacetamid, Vinylsulfone, Mercuri-Verb. Chinone, Maleinimide

-NH₂ : (Lysin, Endgruppe): DNFB; Bernsteinsäureanhydrid
Essigsäureanhydrid

Guanidino -(Arginin): Formaldehyd bei p_H 11

- COOH (Asparagin-, Glutaminsr.);

Endgruppe) : Diazo-Essigester, Epoxyde

Imidazolyl- (Histidin) : Diazoniumsalze (Photooxydation)

Hydroxyphenyl- (Tyrosin): " Jod

Indolyl- (Tryptophan): Formaldehyd, (Photooxydation)

- SCH₃ (Methionin): Jodacetamid

Aliph. -OH (Serin, Threonin): Oxydierende u. wasserentziehende Reagentien

rein aliph. Seitenkette
(Valin, Leucin
Isoleucin) :

Die Methode der Modifizierung von Seitenketten hat jedoch in jüngster Zeit einige interessante Variationen erfahren. Außerdem sind einige neue Reagentien angewandt und alte abgewandelt worden. Es soll daher noch kurz über die neueste Entwicklung auf diesem Gebiet berichtet werden.

Eine der Photooxydation im Prinzip ähnliche Methode ist die kürzlich von VISWANATHA und LAWSON ^{27) 28)} auf Trypsin, Chymotrypsin und ihre Derivate angewandte Oxydation mit N-Bromsuccinimid (NBS). Dabei wird selektiv nur das Tryptophan (im Chymotrypsin allerdings zusätzlich ein besonders reaktionsfreudiges Tyrosin) zerstört; was sich aus dem Vergleich der Gesamt-Aminosäureanalysen von oxydiertem und nichtoxydiertem Enzym ergab. Durch Vergleich des Tryptophangehalts mit der Aktivitätsabnahme ergab sich die Notwendigkeit zumindest eines Tryptophanrestes für die Aktivität des betreffenden Enzyms; die Aktivitätskurve fiel zu Anfang stark ab, knickte dann um und verlief wesentlich flacher. Erwähnenswert ist bei dieser Arbeit die Tatsache, daß die Fähigkeit, das Substrat zu binden, nicht in Mitleidenschaft gezogen wurde; wohl aber die Fähigkeit, es zu spalten. Das deutet erneut auf zwei voneinander entfernte Sequenzen in der Primärstruktur hin, die für die Aktivität Bedeutung haben müssen.

Die von den Autoren angewandte Arbeitsweise führt direkt zu der in letzter Zeit von D.E. KOSHLAND ausgearbeiteten Methodik hin. Sie setzt die Modifizierung der betroffenen Aminosäuren in quantitative Beziehung zum Aktivitätsverlust (es werden Kinetiken gemessen und Reaktionskonstanten aufgestellt); und gewinnt dadurch Aussagemöglichkeiten über Art und Zahl der betroffenen Aminosäuren. So können z.B. Aminosäuren, die schneller zerstört werden als die Aktivität sinkt, nicht in unmittelbarer Beziehung zur enzymatischen Reaktion stehen; Aminosäuren, deren Konstanten sich zur Konstanten des Aktivitätsverlustes addieren, sind

dagegen sehr wahrscheinlich daran beteiligt. Es ist hier nicht notwendig, daß das Reagenz spezifisch für nur eine Aminosäureseitenkette ist; außerdem ermöglicht die Technik eine quantitative Unterscheidung zwischen den verschiedenen Typen von Aminosäuren im aktiven Zentrum (contact, auxiliary und contributing aminoacids, s.o.). Auch eine Aussage darüber, ob bestimmte Aminosäuren für die Aktivität unnötig sind, kann naturgemäß gemacht werden. Die Methode ist sehr zeitsparend gegenüber der üblichen bisher angewandten Arbeitsweise, sie zeigt erneut die enorme Bedeutung des von HIRS, MOORE und STEIN entwickelten Verfahrens zur automatischen Aminosäureanalyse. Sie ist vom RAY und KOSHLAND ausführlich erläutert worden ²⁹⁾. Ihr größter Vorteil liegt wohl in ihrer allgemeinen Anwendbarkeit auf alle Arten biologisch aktiver Proteine.

Eine Technik, die sich die Schutzwirkung des Substrats für das aktive Zentrum gegen den Angriff von vergiftenden Agentien zu Nutze macht, besteht im folgendem Verfahren: man läßt zunächst das Substrat den Enzym-Substratkomplex bilden, der die aktiven Gruppen schützt. Dann folgt Reaktion mit nichtradioaktivem Vergiftungsreagenz, wobei alle durch das Reagenz angreifbaren Gruppen außerhalb des aktiven Zentrums abreagieren. Zum Schluß wird das Substrat entfernt (enzymatische Reaktion und Dialyse) und das nunmehr ungeschützte Enzym wird mit radioaktiv markiertem Reagenz umgesetzt. Dieses kann jetzt nur noch mit den freien Gruppen des aktiven Bereichs reagieren. Ein schwerwiegender Nachteil für die Anwendbarkeit dieser Methode ist allerdings die Notwendigkeit, daß man ein Substrat mit einigermaßen kleiner Dissoziationskonstante und dadurch veranlaßter Schutzwirkung zur Verfügung haben muß, damit die Ausbeute an radioaktiv markiertem Enzym nicht zu sehr absinkt. ¹⁴⁾

Ein elegantes, leider aber nur in speziellen Fällen anwendbares Verfahren ist das sogenannte "Substrate Labelling", d.h. die Markierung mit Hilfe des Substrats. Dabei tauscht das Substrat eine Gruppe mit dem Enzym aus. Z.B. wandert bei der Phosphoglukomutase die Phosphatgruppe des Glucose-6-Phosphats an das Serin des Proteins und bildet dort Phosphoserin. Mit Hilfe von radioaktivem Phosphat wurde hier radioaktiv markiertes Enzym gewonnen, das entsprechende Radiopeptid isoliert und seine Sequenz bestimmt. Dabei wurde nachgewiesen, daß die Sequenz rund um das aktive Serin nicht wie früher gefunden völlig mit der der oben erwähnten Esterasen identisch ist ³⁰⁾. Als aktive Sequenz wurde vielmehr das Peptid -Thr-Ala-SerP-His-Asp- ermittelt. Eine ähnliche Methode wurde auch bei der Phosphorylase A angewandt ³¹⁾. Die Methode hat naturgemäß einen eng begrenzten Anwendungsbereich, es sind jedoch ähnliche Verfahren vorgeschlagen worden, die mit abgewandelten Substraten arbeiten sollen. Das Substrat soll dabei eine leicht übertragbare Gruppe enthalten, die von ihm natürlich vorzugsweise auf aktive Gruppen des Enzyms übertragen werden würde. (Z.B. Jod-Glutaminsäure für die entsprechende Transaminase oder 5-Jod-DPN für Dehydrogenasen).

Eine Weiterentwicklung ist auch auf dem Gebiet der Reagentien erfolgt. Viele neue SH-Gruppenreagentien wurden entwickelt, die zum Teil sehr spezifisch sind und gute Hemmwirkung entfalten, so daß diese Gruppe wohl die im Augenblick der Erforschung am besten zugängliche ist ³²⁾³³⁾. Das Jodacetamid, ein altbekanntes, aber als recht unspezifisch angesehenes Reagenz, wurde durch zwei gründliche Arbeiten von GUNDLACH, MOORE und STEIN wieder in den Vordergrund gerückt ^{34) 35)}. Durch die Verfolgung der p_H -Abhängigkeit der Reaktion mit Ribonuklease und anschließende Ionenaustauscherchromatographie konnten sie fest-

stellen, daß bei p_H 2,8 nur Methionin (außer der immer reagierenden SH-Gruppe) alkyliert wird, während bei p_H 5,5-6 nur Histidin und zwischen p_H 8,5-10 nur Lysin reagieren. Nebenergebnis dieser Arbeiten war die Bestätigung der schon erwähnten Tatsache, daß durch die Reaktion bei p_H 5,5-6 ein Histidin, und zwar das "aktive", carboxyl-nahe, carboxymethyliert wird.

Eine japanische Forschergruppe ^{36) 37)} entwickelte letztlich ein sehr interessantes Lysin-(beziehungsweise NH_2 -) spezifisches Reagenz, das Trinitrobenzolsulfonat. Dieses Reagenz stößt bei der Reaktion die durch drei Nitrogruppen aktivierte Sulfonatgruppe ab und bildet Trinitrophe-nol-Aminosäuren. Die Reaktion erfolgt bei neutralem p_H und niedriger Temperatur (0 Grad Celsius). Die TNP-Aminosäure ist hydrolysebeständig und hat ein spezifisches Absorptionsspektrum bei 340 m μ , so daß sie in Peptiden leicht entdeckt werden kann. Die Autoren konnten auf diese Weise zwei Lysinreste der Myosin A-ATPase spezifisch markieren; wobei deren Aktivität völlig verschwand. Außerdem konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß diese Gruppen in der Nähe von SH-Gruppen liegen, (die ebenfalls für die Aktivität verantwortlich sein sollen), da die Reaktion mit TBS durch die Anwesenheit von SH-Reagentien (PClMB, Mersalylsäure) wesentlich herabgesetzt wurde.

Ein weiteres interessantes (allerdings reversibel hemmendes) neues Reagenz ist das von einem französischen Team benutzte Roussin'sche Salz ^{38) 39)}, ein kompliziert gebauter Nitroso-Eisenkomplex der Formel $[Fe_4 S_3 (NO)_7] K$ das aber auf einfache Weise dargestellt werden kann. Die Autoren zeigen in ihrem Bericht an der Reaktion mit Hochpolymeren, daß der Stoff nur mit der NH_2 -Gruppe (Lysin) und der Imidazol-Gruppe des Histidins reagiert. Verschiedene Dehydrogenasen und die Ribonuklease (diese wahr-

scheinlich durch Beteiligung des aktiven Histidins) werden stark gehemmt. Besonders intensiv ist die Hemmwirkung an der Lactatdehydrogenase, was die Beteiligung einer der genannten Aminosäuren (Lysin oder Histidin) an der enzymatischen Reaktion sehr wahrscheinlich macht.

Zum Abschluß dieser kurzen Übersicht soll noch über die Anwendung von gefärbten oder farbbildenden Reagentien als einer weiteren Variationsmöglichkeit der allgemeinen Methode berichtet werden. Diese Reagentien haben den Vorteil, nach vorausgegangener enzymatischer Hydrolyse die Isolierung derartig markierter Peptide durch ihre Farbe und die dadurch mögliche spektrophotometrische Verfolgung der Aufarbeitung wesentlich zu erleichtern. Sie sind damit in gewissem Sinne den radioaktiv markierten Hemmstoffen an die Seite zu stellen. Bestes Beispiel für diese Art von Reagentien ist das Dinitrofluorbenzol, das Aminogruppen mit dem gelb gefärbten DNP-Rest markiert. Beispiele aus der neueren Literatur sind das gefärbte N (4-Dimethylamino-3,5 Dinitrophenyl) maleinimid ⁴⁰⁾, das zunächst an Serumalbumin ausprobiert wurde und dort zur Isolierung und Aufklärung des markierten Peptids beitrug; und das fluoreszierende 1-Dimethylaminophthalin-5-Sulfochlorid, mit dem HARTLEY und MASSEY kürzlich das aktive Zentrum des Chymotrypsins markieren konnten ⁴¹⁾. Auch das oben erwähnte Trinitrobenzolsulfonat gehört hierher, da seine Derivate ja bei 340 m ein charakteristisches Absorptionsspektrum aufweisen.

Bei fortschreitender Verbesserung der Methodik können vielleicht auch einmal die bifunktionellen Reagentien, wie sie besonders vom Arbeitskreis von ZAHN entwickelt wurden ^{42) 43)}, Bedeutung erlangen. Sie führen zusätzliche feste Bindungen zwischen den Peptidketten ein und stabilisieren so die Tertiärstruktur. Ist ein solcher Stoff zugleich Hemmstoff, so fixiert er gewissermaßen die aktive Sequenz in ihrer aktiven Lage und gestattet, auch die räumlich gegenüberliegende Sequenz aufzuklären.

III. Grundlagen und Ziel der Arbeit

Die durch Kupplungsreaktion von Diazoniumsalzen mit Proteinen gebildeten Azoproteine hatten lange Zeit große Bedeutung auf dem Gebiet der Immunologie, da die Reaktion eine bequeme Methode darstellt, Proteine unter nicht denaturierenden Bedingungen definiert abzuwandeln. Bei der Immunisierung mit solcherart veränderten Antigenen treten Antikörper auf, die spezifisch auf die eingeführte Gruppe abgestimmt sind. Pionier auf diesem Gebiet war K. LANDSTEINER. Neuere Arbeiten auf diesem Gebiet sind von HAUROWITZ ⁴⁴⁾ und KATCHALSKY ⁴⁵⁾ publiziert worden, eine zusammenfassende Übersicht gibt O. WESTFAL ⁴⁶⁾.

Die Arbeiten auf dem Gebiet der Enzymmarkierung sind dagegen recht selten, (z.B. ⁴⁷⁾) da das Reagenz allgemein für zu unspezifisch gehalten wurde. Neuerdings bewiesen jedoch TABACHNIK und SOBOTKA ⁴⁸⁾ ⁴⁹⁾, daß in Proteinen zu rund 50 % Histidin- und Tyrosinreste und zu etwa 40 % Lysinreste reagieren, die restlichen 10-15 % der eingeführten Azogruppen liegen wahrscheinlich in der Art von Einschlußverbindungen vor. Damit wird das Reagenz Diazoniumsalz wieder interessant, zumal da es als Markierungsreagenz mehrere beachtliche Vorteile besitzt, nämlich:

1. Reaktion unter fast "physiologischen" Bedingungen
2. Inaktivierung des Enzyms durch relativ wenig überschüssiges Reagenz
3. Meßbarkeit der Zahl von modifizierten Aminosäuren (optische Methode von TABACHNIK und SOBOTKA)
4. Bildung gefärbter Derivate
5. Leichte radioaktive Markierbarkeit.

Die vorliegende Arbeit diente dem Ziel, zu ermitteln, welche Seitenketten außer den drei SH-Gruppen (deren Notwendigkeit für die Aktivität schon längere Zeit bekannt

ist) für die enzymatische Reaktion der Lactatdehydrogenase aus Schweineherz notwendig ~~sind~~ sind. Ferner sollte versucht werden, radioaktiv markierte Bruchstücke des aktiven Zentrums dieses Enzyms zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurden Studien über die Spezifität des Reagenz' angestellt, sowie Probereaktionen an einem Enzym bekannter Struktur (Ribonuklease) vorgenommen.

B. Spezieller Teil

I. Reaktion mit Aminosäuren

Da bei Beginn der Arbeit nur wenig über die Natur der Reaktion von funktionellen Gruppen eines Proteins mit Diazoniumsalzen veröffentlicht war und die bekannten Arbeiten sich zum Teil widersprachen, wurden zunächst Versuche mit freien Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten vorgenommen. Der Zweck solcher Versuche war erstens, festzustellen, welche Aminosäuren mit den Diazoniumsalzen reagieren und welche nicht; zweitens bei den reagierenden Aminosäuren festzustellen, welcher Art die Reaktion war und Spektren sowie Vergleichsstoffe zu bekommen.

Dabei ist es vielleicht von Nutzen, zunächst die bisherigen Ergebnisse zu referieren. Die Versuche, die bisher an Aminosäuren vorgenommen wurden, begannen mit der Arbeit von PAULY ⁵⁰⁾, der Aminosäuren mit diazotierter Sulfanilsäure in alkalischer Lösung reagieren ließ und die Farbe beobachtete. Dabei bildeten nur Tyrosin und Histidin Lösungen, die stärker gefärbt waren als die Diazoniumsalzlösung. Später ⁵¹⁾ isolierte er die Azofarbstoffe dieser zwei Aminosäuren mit diazotierter Arsanilsäure. Die Ausbeuten waren schlecht, da Nebenreaktionen auftraten (Stickstoffentwicklung sowie wie beim Histidin-farbstoff Verharzung). Die Analysenwerte entsprachen in beiden Fällen den Bis-Azofarbstoffen. Versuche an Tryptophan blieben ohne Ergebnis. (Zwar reagierte Indol, jedoch 3-substituierte Indole sowie Tryptophan selbst nur sehr schwach).

Durch Studien an Azoproteinen veranlaßt, begann man später zu prüfen, ob nicht auch andere funktionelle Gruppen

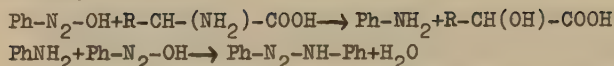
in Proteinen mit dem Diazonium-Reagenz Verbindungen bilden. Man fand nämlich bei Versuchen mit diazotierter Arsanilsäure und diazotiertem Jodanilin einen wesentlich höheren Arsen-(bzw. Jod)-Gehalt als dem Gehalt an Tyrosin + Histidin entsprach. EAGLE und VICKERS ⁵²⁾ untersuchten daraufhin quantitativ die Reaktion von Aminosäuren mit Diazoniumsalzen, indem sie die betreffende Aminosäure eine halbe Stunde mit Diazonium-Reagenz stehen ließen und nach Ablauf dieser Zeit dessen Inaktivierung mittels β -Naphthol bestimmten. So stellten sie fest, daß Glycin, Lysin (Ornithin), Prolin (bzw. Hydroxyprolin) und Indol das Reagenz inaktivierten, nicht aber Arginin, die Peptidbindung sowie Säureamidgruppen (der Befund über Indol stimmt hier mit der Arbeit von PAULY überein, Tryptophan selbst wurde nicht getestet). Später wurden Verbindungen von Aminosäuren mit verschiedenen Diazoniumsalzen dargestellt; so das Triazen des Glycins mit diazotiertem Anilin und Nitranilin ⁵³⁾.

1954 fand ZAHN ⁵⁴⁾ beim Besprühen von Aminosäure-Chromatogrammen mit Pauly's Reagenz (diazotierte Sulfanilsäure in sodaalkalischer Lösung) weiße Flecken für Cystein, Prolin und Hydroxyprolin, während die übrigen Aminosäuren (außer Histidin und Tyrosin) gelbe Flecken ergaben. Er stellte daraufhin das Diazomercaptan des Cysteins sowie das Triazen des Prolins mit diazotiertem 5-Cl-2-Methylanilin her. Bei der Reaktion mit Valin und Leucin erhielt er die entsprechenden Hydroxysäuren.

1957 veröffentlichten dann HOWARD und WILD ⁵⁵⁾ eine gründliche Studie über die Reaktion von Aminosäuren mit dem Diazo-Reagenz. Sie hatten folgendes gefunden:

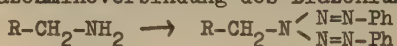
1. Die α -Aminogruppe (die in Proteinen, außer in der Endgruppe, gebunden ist) wird in die α -Hydroxygruppe überführt. Dabei bildet sich außerdem das Diazoaminobenzol des entsprechenden Diazoniumsalzes gemäß folgender

Gleichung



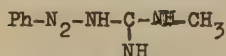
Die Autoren isolierten z.B. bei Experimenten mit Phenylalanin Phenylmilchsäure (vergl. die Arbeit von ZAHN, s.o.)

2. Die ω -Aminogruppe bildet die Bis-(Diazoamino)-Verbindung (ein Pentazen), ohne daß merkliche Mengen der Diazoaminoverbindung des Diazoniumsalzes selbst entstehen.



Beispiele der Autoren sind β -Alanin, γ -Aminobuttersäure, ϵ -Aminocaprönsäure, sowie viele aliphatische Amine. Analog reagiert auch freies Glycin.

3. Die Reaktion der Guanidinogruppe wurde am Methylguanidin untersucht. Die Autoren fanden als Reaktionsprodukt Benzoldiazo-Methylguanidin mit einer Azogruppe im Molekül.



4. SH-Gruppen

Hier wurde bei der Reaktion mit Äthanthiol der Thioäther isoliert (s. auch ⁶³). Er entsteht wohl aus dem instabilen Diazo-Mercaptan.

5. Indolyl-Gruppen

Es wurde ein Versuch mit Indolyl-3-Essigsäure unternommen. Dabei ergab sich ein instabiles, nicht isolierbares Produkt, das verharzte.

Die Arbeit von HIGGINS und HARRINGTON ⁵⁶), (s. auch ⁵⁷)⁵⁸) (die mit Hilfe eines Spektralphotometers die Änderungen des Spektrums bei der Reaktion verfolgten, aber keine Stoffe isolierten) berichtet von der Reaktion des Diazoniumsalzes mit Lysin, Prolin und Arginin, wobei aber die Extinktion beim Arginin recht niedrig lag (was wohl darauf

hindeutet, daß die Reaktion, wenn überhaupt, nur sehr unvollständig ablief.) Der Eigenzerfall des Diazoniumsalzes in alkalischer Lösung wurde nicht berücksichtigt; außerdem wurde die Reaktion der α -Aminogruppe nicht beachtet. Die Autoren geben Absorptionsmaxima an, die für die Monoverbindungen bei 330 (Tyrosin) und 380 m μ (Histidin) sowie für die entsprechenden Bisazofarbstoffe bei 480 (Tyrosin) bzw. 490 m μ (Histidin) liegen. Die Angaben für den Bisazofarbstoff des Tyrosins werden jedoch durch die späteren Arbeiten von TABACHNIK und SOBOTKA eindeutig widerlegt.

Die erste Arbeit dieser Autoren, die 1959 erschien ⁵⁹⁾, weist zunächst auf die Notwendigkeit hin, α -Acyl- oder α -Desaminoderivate als Studienobjekte zu wählen, da sonst stets zwei funktionelle Gruppen im Molekül vorhanden sind und somit die Reaktion nicht eindeutig abläuft. Sie wählten N-Chloracetyl-Tyrosin, Acetyl-Histidin bzw. ϵ -Aminocaprinsäure als Tyrosin, Histidin- und Lysinderivate und diaz. Arsanilsäure als Diazoniumsalz. Sie stellten den Mono- und Bisazofarbstoff des Chloracetyl-Tyrosins sowie das Pentazen der ϵ -Aminocaprinsäure dar. (Histidinfarbstoffe fehlen hier.) Sodann wurden Spektren mit freien und acylierten Aminosäuren aufgenommen. Dabei stellte sich heraus, daß die Reaktion der Aminogruppe mit dem Diazoniumsalz kompetitiv zur "Kern"-reaktion und wesentlich langsamer ist. Wichtigstes Ergebnis war jedoch der Befund, daß das Maximum bei 480 m μ , das von HIGGINS und HARRINGTON dem Bisazofarbstoff des Tyrosins zugeschrieben wurde, im alkalischen Milieu dem Monoazofarbstoff eigentümlich ist. Bisazo-Tyrosin hat hingegen im alkalischen Milieu ein Maximum bei 545 m μ . Erwähnenswert ist noch, daß PAULY's "Bisazo-Tyrosin" nicht bestätigt werden konnte, daß vielmehr bei der Reproduktion des Versuchs mehrere, chromatographisch trennbare farbige Substanzen entstanden.

Nachdem im Vorhergehenden zusammenfassend über die wenigen bisher auf diesem Gebiet erschienenen Arbeiten referiert worden ist, soll nun über die eigenen Ergebnisse berichtet werden.

Wir wählten als Diazoniumsalz zunächst diazotiertes p-Nitranilin, das nach allgemeinen Angaben des Buches von HOUBEN-WEYL, Band IV ⁶⁰⁾ aus p-Nitranilinhydrochlorid und Isoamylnitrit in Eisessig hergestellt und durch Fällen mit Äther in festem Zustand isoliert wurde. Dieses Diazoniumsalz gestattet die leichte Isolierung von festen Farbstoffderivaten (im Gegensatz zur diazotierten Sulfanilsäure) und kuppelt (durch die positivierende Wirkung der Nitrogruppe veranlaßt) im relativ sauren Milieu; d.h. im physiologischen p_H -Bereich (die anderen Diazoniumsalze kuppeln gut erst an dessen alkalischer Grenze). Da jedoch die Nitrogruppe eine stark farbvertiefende Wirkung hat und über Spektren von Aminosäure-p-Nitranilinfarbstoffen bisher noch nicht zusammenfassend berichtet worden ist, war es zunächst notwendig, die Reaktion dieses Diazoniumsalzes mit Aminosäuren mittels Spektren und Isolierung von Farbstoffen genauer zu untersuchen. Als Puffer wählten wir Phosphat p_H 7,8, in dem das später zu untersuchende Enzym (die Lactatdehydrogenase) sehr stabil ist.

Zunächst wurde die Zerfallsreaktion des diazotierten p-Nitranilins spektrophotometrisch verfolgt. Dabei wandelt sich (Reaktion mit OH^- , s. 61) dieses Diazoniumsalz langsam in sein entsprechendes Diazoaminobenzol, Isodiazotat und einen "unbekannten alkaliumlöslichen Stoff mit 12,9 % Stickstoffgehalt" um. Spektrophotometrisch sah das folgendermaßen aus:

Zunächst war nur das Maximum des Diazoniumsalzes selbst bei 260 $m\mu$ zu erkennen. Dann entsteht schnell ein neues großes Maximum bei 320 $m\mu$ (wohl das Isodiazotat), das

sich allmählich bis 350 m μ verschiebt. Gleichzeitig taucht ein neues breites Maximum bei 390 m μ auf, das wahrscheinlich in der Hauptsache dem Diazoaminobenzol entspricht.

Sodann wurde die Reaktion des Diazoniumsalzes mit α - Acylamino-Derivaten des Tyrosins, Histidins und dem ϵ - Desamino-Derivat des Lysins untersucht, um das Vorhandensein zweier reaktionsfähiger Gruppen im Molekül zu verhindern, und zwar wurde jedes Mal sowohl die Reaktion mit Unterschuß (um Monoderivate zu erhalten) bzw. Überschuß Reagenz (um Spektren von Bisazoderivaten aufnehmen zu können) verfolgt.

a.) N-Chloracetyl-Tyrosin (als geschütztes Tyrosinderivat)

Reaktion mit diazot. p-Nitranilin

Für das Monoazoderivat ergab sich im Phosphatpuffer ein Maximum bei 335 m μ mit einem charakterischem Buckel in 400 m μ -Gebiet, beim Zusatz von NaOH (Endkonzentration 0,1) bildeten sich zwei Maxima bei 345 und 515 m μ aus. Das Bisazoderivat entsteht unter den vorliegenden Bedingungen nicht vollständig, sondern ist mit großen Mengen des Monoderivats vermischt. Unter Versuchsbedingungen mit überschüssigem Diazoniumsalz entsteht in Phosphatpuffer ein Spektrum mit einem großen Maximum bei 335 m μ und einem weitaus kleineren bei 565 m μ , das sich auch bei Veränderung der Menge des überschüssigen Diazonium-Reagenz nicht verschiebt und, wie sich später zeigte, mit dem Maximum des reinen Bisazo-Derivats identisch ist. Bei Zusatz von 0,1 n NaOH dagegen entsteht ein Mischspektrum beider Azoderivate des N-Chloracetyl-Tyrosins, nämlich Maxima bei 335 m μ und 530 m μ .

Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure

Hier gilt das entsprechende. Die Farbstoffe haben genau die gleichen Maxima wie von TABACHNIK und SOBOTKA für die Arsanilsäurederivate angegeben, so daß sie hier nicht näher besprochen zu werden brauchen. Somit sind TABACHNIK und SOBOTKA vollständig bestätigt, und die Beobachtung von HIGGINS und HARRINGTON, daß das Bisazoderivat des Tyrosins ein Maximum bei 480 m μ habe, ist widerlegt.

b.) Acetyl-Histidin

Acetyl-Histidin wurde nach einer Vorschrift von BERGMANN und ZERVAS selbst hergestellt und elektrophoretisch auf Reinheit geprüft (Identifizierung durch Besprühen mit Pauly's Reagenz).

Reaktion mit diazot. p-Nitranilin

Bei großem Überschuß an Acetyl-Histidin ergibt sich das Spektrum des reinen Monoazoderivats: ein kleines Maximum bei 285 m μ sowie ein großes bei 395 m μ . In Natronlauge verschiebt sich das Letztere nach 465 m μ . Das Bisazoderivat (das wesentlich leichter zu reinigen ist als das Monoazoderivat) hat ein großes Maximum bei 525 m μ sowie ein kleines breites bei 290 m μ , das sich auf Zusatz von Natronlauge nicht verschiebt.

Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure

Das Monoazoderivat hat das gleiche Spektrum wie das von TABACHNIK und SOBOTKA für das Arsanilsäurederivat gefundene, das Bisazospektrum war wegen der schwierigen Darstellbarkeit reiner Derivate der diazotierten Sulfanilsäure leider nicht zugänglich. Hier kann also die Behauptung von HIGGINS und HARRINGTON (Maximum im Gebiet von 490 m μ für das Bisazoderivat zutreffen, wenn man nach den Verhältnissen bei den Derivaten des diazotierten p-Nitranilins urteilt. Allerdings kann für ein Maximum

im Gebiet von 480 - 490 m μ vielerlei verantwortlich gemacht werden (wie die folgenden Messungen zeigen), so daß hier keinerlei eindeutige Rückschlüsse möglich sind.

Mischspektren von Tyrosin- und Histidin-Farbstoffen mit diaz. p-Nitranilin

Da in Proteinen beide Arten von Farbstoffspektren vorkommen, wurden äquimolekulare Mengen von N-Chloracetyl-Tyrosin und Acetylhistidin mit Unterschluß Diazoniumsalz gekuppelt (es sollen ja hauptsächlich die Monoazo-Kupplungsprodukte entstehen) ¹⁴). Dabei ergab sich folgendes Bild: in Puffer waren die beiden getrennten Maxima der Farbstoffe bei 340 bzw. 395 m μ gut zu unterscheiden (der Buckel des Tyrosin-Farbstoffes bei 400 m μ fehlte allerdings). In Natronlauge dagegen waren 2 Maxima, bei 350 m μ und 485 m μ vorhanden. Das bei 350 m μ dürfte wohl dem Tyrosin entsprechen, während das bei 485 m μ ein typisches "gemischtes Maximum" ist.

Mischspektren der diazotierten Sulfanilsäure

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Farbstoffen der diazotierten Sulfanilsäure. In Puffer liegen hier die Maxima bei 325 (Tyrosin) bzw. 380 m μ (Histidin), gut zu unterscheiden. In Natronlauge hingegen entsteht wieder das "gemischte Maximum", hier bei 445 m μ . Es ist also durch Auflösen eines gekuppelten Proteins und Aufnahme seines Spektrums nicht ohne weiteres möglich, Schlüsse auf das Verhältnis von gekuppeltem Tyrosin zu gekuppeltem Histidin zu ziehen.

c) ϵ -Aminocaprönsäure als α -Desamino-Lysin

Die leicht zu beschaffende Aminocaprönsäure (Caprolaktam, Perlön!) bietet sich als Lysinderivat hier ganz natürlich an, da es relativ schwierig ist, die α -Aminogruppe selektiv zu acylieren. Ihr Bisazoderivat mit diazotiertem

p-Nitranilin (das oben formulierte Pentazon) hat in Puffer bei 390 m μ ein Maximum. In Natronlauge verhält sich dieser Farbstoff jedoch überraschend. Es wird neben dem Maximum bei 390 m μ (das fast ganz verschwindet) ein Maximum mit einem sehr hohen Extinktionskoeffizienten bei 512 m μ ausgebildet. Bei dem analogen Derivat der diazotierten Sulfanilsäure ist die Verschiebung ungleich geringer: von 368 auf 382 m μ .

4.) Darstellung der Farbstoffe der Hauptkuppler mit diazotiertem p-Nitranilin

Um die bisher durch Spektrenmessung gewonnenen Ergebnisse zu verbessern oder zu untermauern, wurde versucht, die entsprechenden Farbstoffe des diazotierten p-Nitranilins in Substanz darzustellen.

a.) N-Chloracetyl-Tyrosinfarbstoffe

Die Darstellung des Monoazofarbstoffes ist hier recht einfach. Mit einem geringen Überschuß an diazotiertem p-Nitranilin ergibt sich der orangerote Farbstoff nach der analogen Vorschrift von TABACHNIK und SOBOTKA (für diazotierte Arsanilsäure) nach Umkristallisieren aus Petroläther chromatographisch rein. Das Spektrum stimmte mit dem in Lösung gemessenen völlig überein. Der Bisazofarbstoff war nicht so einfach darzustellen, bei Befolgung der Analog-Vorschrift von TABACHNIK und SOBOTKA fiel ein braunes Stoffgemisch von Mono- und Bisazofarbstoff an. Es wurde chromatographiert, der Bisazofarbstoff aus dem Chromatogramm eluiert und das Spektrum aufgenommen. Dadurch ergaben sich die oben erwähnten und in der Tabelle des experimentellen Teils angeführten Wellenlängenwerte für die Maxima. Hier ist also offensichtlich die Bildung eines Bisazofarbstoffs durch das Vorhandensein einer ersten Azogruppe im Molekül behindert. Die Farbe der Farbstoffe in Natronlauge ist rotviolett.

b.) Acetyl-Histidin-Farbstoffe des diazotierten p-Nitranilins

Während die Isolierung der N-Chloracetyl-Tyrosinfarbstoffe somit keine größeren Schwierigkeiten bereitet und sich der Ermittlung von spezifischen Maxima und Extinktionskoeffizienten nichts in den Weg stellte, bereiten die entsprechenden Acetyl-histidin-Farbstoffe wesentlich größere Mühe. Schon PAULY weist auf die Säureempfindlichkeit (leichtes Verharzen) der Histidinfarbstoffe hin, ebenso letztlich SLUYTERMAN⁶²⁾ auf ihre Sauerstoffempfindlichkeit. Während ziemlich reines Bisazo-Acetylhistidin noch relativ einfach dargestellt werden und dieses dann durch Chromatographie weiter gereinigt werden konnte, bereitete die Darstellung des Monoazoderivats unüberwindliche Schwierigkeiten. Es gelang nur einmal, mit Säure unter Äther ein prachtvoll ziegelrotes Produkt auszufällen, das aber beim Aufarbeiten an der Luft braun wurde und verharzte. Schüttelt man eine mit fünf- bis zehnfachem Überschuß an Acetylhistidin bereitete Lösung des Farbstoffs mit Essigester aus und chromatographiert, so bekommt man ein Produkt, das mit nur geringen Beimengungen eines anderen Farbstoffs und Acetylhistidin verunreinigt ist. (Sonst 5-7 Farbstoffe!). Beim Aufarbeiten, selbst durch Chromatographie, erlitt der Farbstoff jedoch immer wieder Umwandlungen in andere Produkte. Analogvorschriften gibt es, wohl aus diesen Gründen, bisher nicht. Die Verhältnisse bei den Acetylhistidinfarbstoffen der diazotierten Sulfanilsäure, die direkt aus der Lösung chromatographiert wurden, liegen ganz ähnlich.

c.) Farbstoff der ϵ -Aminocaproensäure mit diazotiertem p-Nitranilin

Die Herstellung dieses Farbstoffs war einfacher als nach der Analogvorschrift von TABACHNIK und SOBOTKA zu erwarten war. Er fiel während der Reaktion und beim Ausfällen mit

Säure chromatographisch rein in Form eines gelben Niederschlags an. Die Löslichkeit in Wasser ist außerordentlich gering, nur wenig größer die in Natronlauge. In Natronlauge löst sich der Farbstoff mit tiefroter Farbe, die sehr intensiv ist. ($> 70000!$) Die intensive Farbe dieses Ly-sinderivats war einer der Hauptgründe dafür, warum wir bei der Reaktion mit Proteinen später das diazotierte p-Nitranilin als Diazokomponente verließen, denn dadurch war die von TABACHNIK und SOBOTKA ausgearbeitete optische Methode zur Bestimmung der Kupplungsrate von Histidin und Tyrosin hier nicht zu verwenden.

5.) Hydrolyse der Farbstoffe der Hauptkuppler

Um später Vergleiche der Aktivitätsabnahme von Enzymen mit dem Verlust an freiem Histidin bzw. Tyrosin ziehen zu können, war es notwendig, zu beweisen, daß unter Hydrolyse-Bedingungen auch nicht in geringen Mengen freie Aminosäuren aus den Farbstoffen rückgebildet werden. Wir unterwarfen daher ein "Monoazo-Acetylhistidin-Präparat" (das neben Monoazofarbstoff große Mengen der Bisazokomponente sowie Beimengungen weiterer Farbstoffe enthielt, jedoch "durchgekuppelt" war) und ein Monoazo-Chloracetyltyrosin-Präparat der Hydrolyse mit 6 n HCl bei 110° C. Es bildeten sich schneller wandernde Folgeprodukte, jedoch konnte mittels Ninhydrin und Pauly's Reagenz keine freien Aminosäuren entdeckt werden (Vergleichssubstanzen wurden mitlaufen gelassen).

Da der Nachweis auf freie ϵ -Aminosäurecapronsäure nicht so einfach zu führen ist, unternahmen wir, um die Verhältnisse bei gekuppeltem Lysin klarzustellen, einen Versuch mit der B-Kette des Insulins, in dem die α -Aminogruppe des Lysins ja peptidartig gebunden vorliegt. Insulin B-Kette wurde mit Diazoniumsalz umgesetzt, das Azopeptid

gefällt, gewaschen und hydrolysiert. Im Pherogramm trat in geringen Mengen freies Lysin auf, jedoch viel schwächer als Arginin, das ebenfalls nur einmal in der Kette vertreten ist. Das kann daher rühren, daß nicht in allen Molekeln das Lysin mit dem Diazoniumsalz reagiert hat, kann aber auch auf geringfügige Rückspaltung des schon gebildeten Farbstoffs hindeuten. Auf keinen Fall jedoch tritt quantitative Rückspaltung ein. Freies Histidin und Tyrosin (die in der ungekuppelten B-Kette ebenfalls vorhanden sind) waren nicht nachzuweisen. Der Versuch zeigte wieder, wie schon die Reaktion des diazotierten p-Nitranilins mit Kreatin, daß die Guanidinogruppe des Arginins wohl nicht mit Diazoniumsalzen reagieren dürfte.

6.) Versuche mit anderen Aminosäuren bzw. deren Derivaten

a) Phenylalanin

Diese Aminosäure sollte mehreren Autoren zufolge als Vertreter der nichtkupplungsfähigen Aminosäuren (bei denen nur die Aminogruppe reagiert) als Reaktionsprodukt das Diazoaminobenzol ergeben. (s.o.) Bei der spektrophotometrischen Verfolgung der Reaktion ergab sich das relativ schnelle Entstehen eines Maximums bei 380 m μ . Als Vergleich wurde nun nach den allgemeinen Angaben der schon oben zitierten Literaturstelle 61) reines Dinitro-Diazoaminobenzol hergestellt. Es hatte tatsächlich im Puffer ein Maximum bei 380 m μ . Die Befunde der genannten Autoren sind somit bestätigt.

b) Indolyl-Essigsäure (als Tryptophan-Analoges)

Da in der Literatur bisher mehr oder weniger Unklarheit über die Reaktion des Tryptophans mit Diazoniumsalzen herrschte, wurde ein Versuch mit Indolylacetat (K-Salz) angesetzt. Bei der Reaktion entstand schon nach 30 Minu-

ten ein Maximum bei genau 400 m μ , das sich zeitlich nicht veränderte. Daraufhin wurde versucht, einen Stoff zu isolieren. Das gelang überraschend glatt: es fiel auf Zusatz von diazotiertem p-Nitranilin zu der Lösung von K-Indolylacetat in Phosphatpuffer ein eigelber Stoff aus, der abfiltriert und gewaschen wurde, und der das schon gemessene Maximum von 400 m μ aufwies. Auf Zusatz von Natronlauge verschob es sich nach 460 m μ . Beim leichten Erhitzen in wässriger Lösung (Umkristallisierungsversuch) verharzte das Produkt zu einer roten Schmiere. Ähnliche Beobachtungen machten HOWARD und WILD bei der Reaktion von Indolyl-3-Essigsäure mit Benzoldiazoniumchlorid, es gelang ihnen jedoch nur, ein Harz zu isolieren, während zu Anfang ebenfalls ein gelber Niederschlag, dann jedoch Gasentwicklung auftrat. Offensichtlich entsteht zuerst ein Triazen-Analoges, das sich in der Wärme zu C-Azoverbindungen umlagert. Die Reaktion mit Tryptophan muß also nun als sicher angesehen werden, allerdings findet sie in Proteinen wohl nur in geringem Maße statt.

c) Prolin

Die einzige gegen Diazoniumsalze reaktionsfähige Gruppe des Prolins (die NH-Gruppe) ist in Proteinen gebunden. Die Reaktion hat also keine Bedeutung für die Erforschung des Verhaltens der Proteine. Dennoch wurde der Vollständigkeit halber auch hier ein Versuch unternommen, Es entsteht ein Farbstoff mit einem Maximum bei 378 m μ (also genau wie beim Dinitro-Diazoaminobenzol) der jedoch nicht sehr stabil zu sein scheint, denn die Extinktion nimmt nach einer gewissen Zeit laufend ab, während die Lage des Maximums konstant ist.

d) Kreatin als Arginin-Analoges

Der Verlauf dieser Reaktion glich in allen Phasen dem Zerfall des diazotierten p-Nitranilins. Er war nur zeit-

lich ein wenig schneller. Diese Beobachtung (zusammen mit anderen, später zu erwähnenden und mehreren Literaturstellen) läßt den Schluß zu, daß die Reaktion des Arginins zumindest unwahrscheinlich ist.

e) Thioglykolsäure als Cystein-Analoges

SH-Gruppen reagieren nach BEILSTEIN Band XVI ⁶³⁾ mit Diazoniumsalzen unter Bildung von Thioäthern

- S -  - NO₂ die wahrscheinlich aus Diazomercaptanen
- S - N = N -  - NO₂ durch deren Zerfall entstehen,
wie die Beobachtungen von ZAHN ⁵⁴⁾ zeigen. Die Reaktion wurde spektrophotometrisch auf ihre Geschwindigkeit geprüft. In Phosphatpuffer p_H 7,8 geht sie ziemlich langsam vonstatten, das erste langsam entstehende Maximum (bei 350 mμ) verschiebt sich weiter ins Langwellige unter Verbreiterung (bei 380 mμ) nach beiden Seiten. Eine Überlagerung des Diazoniumsalzzerfalls ist hier sehr wahrscheinlich.

f) Carnosin

Im Carnosin, einem Dipeptid aus Muskelfleisch (β-Alanyl-Histidin) ist ebenfalls die Aminogruppe des Histidins acyliert, außerdem ist eine weitere interessante funktionelle Gruppe vorhanden, die freie ω-Aminogruppe des β-Alanins. Dieses Dipeptid stellt also eine Art Eiweißmodell im Kleinstmaßstab für Versuche mit Diazoniumsalzen dar. Daher wurden auch hier die Spektren der entstehenden Farbstoffe aufgenommen. Mit Überschuß an Carnosin entsteht das reine Spektrum eines acylierten Histidinfarbstoffs (Maxima bei 285 und 395 mμ), was deutlich die Bevorrechtigung der momentanen Histidinkupplung vor der langsameren Reaktion mit der ω-Aminogruppe des β-Alanins zeigt. Mit größerem Überschuß an Diazoniumsalz

verschiebt sich dagegen das ursprüngliche Maximum bei 395 m μ etwas ins Kurzwelligere, daneben taucht ein kleiner Buckel im Gebiet von 525 m μ auf, was auf Bildung des Bisazo-Histidinfarbstoffs in geringem Umfang zurückzuführen sein dürfte. Carnosin verhält sich also wie zu erwarten: vorzugsweise Bildung des Monoazo-Acylhistidin-Farbstoffs, daneben in geringem Umfang Reaktion der ω -Aminogruppe und Bildung des Bisazofarbstoffs.

g) Reaktion des α -Desamino-Lysin-Pentazens sowie des Diazo-Aminobenzols mit Resorcin

Da wir hofften, eine Lysinkupplung im Protein sei vielleicht reversibel und auf diese Weise von der Kupplung mit Tyrosin und Histidin zu unterscheiden, versetzten wir eine sehr verdünnte Lösung der (in wässrigem Milieu schlecht löslichen) oben angeführten Stoffe mit Resorcin, um so etwa im Gleichgewicht vorhandenes Diazoniumsalz abzufangen und die Triazene auf diese Weise allmählich zu spalten. Es konnte jedoch keine Reaktion beobachtet werden, die Maxima der beiden Triazene blieben unverändert erhalten. (Das Maximum des Resorcinfarbstoffes mit diazotiertem p-Nitranilin liegt im Puffer bei 450 m μ , das des entsprechenden Farbstoffs mit diazotierter Sulfanilsäure bei 430 m μ .)

7.) Als Ergebnis der Versuche von Aminosäuren und deren Derivaten mit Diazoniumsalzen läßt sich nun kurz zusammengefaßt folgendes feststellen: es reagieren Tyrosin, Histidin, Lysin, Tryptophan und die SH-Gruppe, ferner Prolin, dessen reaktionsfähige Gruppe aber im Proteinverband nicht frei ist. Die Guanidinogruppe des Arginins reagiert dagegen höchstwahrscheinlich nicht. Die SH-Kupplung kann durch Schutz mit Mercuriverbindungen unterdrückt werden, und die Arbeiten von TABACHNIK und SOBOTKA 48) 49) 59) zeigen, daß in SH-freien Proteinen hauptsächlich Lysin,

Tyrosin und Histidin (in der genannten Reihenfolge) zu reagieren scheinen, so daß die Bedeutung der Tryptophan-Kupplung wohl nicht sehr groß ist. Als "Hauptkuppler" bleiben also die drei oben genannten Aminosäuren (Lysin, Tyrosin und Histidin) übrig.

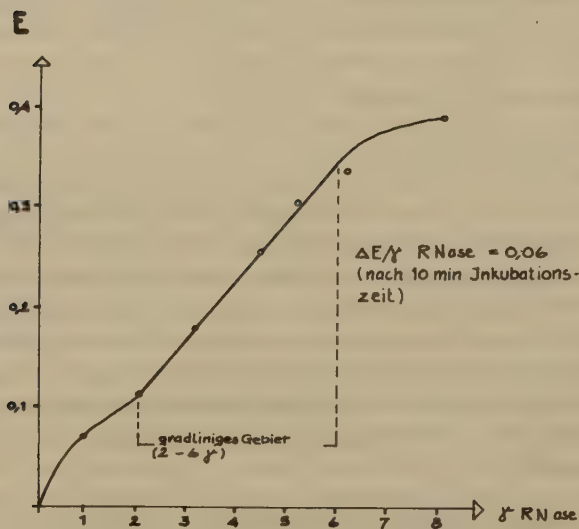
II. Reaktion mit Proteinen

1.) Reaktion mit RNase

Da die Reaktion von Diazoniumsalzen mit Proteinen bisher recht selten auf Enzyme übertragen wurde und deshalb nur wenige Ergebnisse publiziert wurden, beschlossen wir, die Reaktion erst einmal an einem Enzym bekannter Struktur, der Ribonuklease, auszuprobieren. Da hier jüngst die Notwendigkeit eines von 4 Histidinresten für die Enzymaktivität berichtet worden war (s. allgemeiner Teil), ließen sich hier interessante Ergebnisse erwarten. Zudem hat die Ribonuklease keine SH-Gruppen; die S-S-Brücken sind nicht essentiell.

Zunächst wurde der Test der Ribonuklease nach ROGERS und KALNITSKY eingeübt. Dabei ergab sich eine gradlinige Abhängigkeit der gemessenen Oligo-Nukleotid-Extinktion von der Ribonukleasekonzentration im Bereich von 2-6 μ . Wir wählten also fortan die Testbedingungen so, daß die Ribonukleasekonzentration in dieses Gebiet fiel. Sodann wurde als nächstes die Abhängigkeit der Ribonukleaseaktivität vom Diazoniumsalzzusatz getestet. Die in der Tabelle angegebenen Mengen an Diazoniumsalz wurden durch Pipettieren aus einer Lösung entsprechender Konzentration zugegeben. Dabei fiel bei Zusatz von diazotiertem p-Nitranilin (nicht aber diazotierter Sulfanilsäure) die Ribonuklease aus, der Test mußte also aus der Suspension durchgeführt werden. Damit ist zwar eine gewisse Ungenauigkeit verbun-

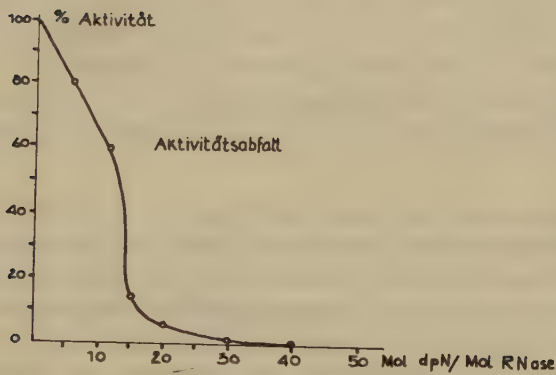
den, die sich jedoch nicht vermeiden läßt.



a) Hemmkurven

Tabelle der Abhängigkeit der Aktivität vom Diazoniumsalz-Zusatz (dpN = diaz. p-Nitranilin)

Mol dpN/Mol RNase	5	10	15	20	30	50
Aktivität in %	81	62	15	6	0	0
Hemmung in %	19	38	85	94	100	100



Zunächst tritt also ein relativ schneller Abfall bis auf 85 % Hemmung auf, der dann langsam in vollständige Hemmung übergeht. Dies weist auf die Beteiligung mindestens einer kupplungsfähigen Aminosäure an der Enzymaktivität hin. (s.a. S. 39 unten, Tabelle)

Zeitabhängigkeit der Reaktion

Um die Geschwindigkeit der Reaktion festzustellen, wurde bei den Grenzkonzentrationen zum völligen Aktivitätsverlust nach verschiedenen Zeiten die Aktivität gemessen.

Tabelle:

(30 μ M dpN/ μ M RNase)

Zeit (h)	1	2	3	4	5
Aktivität (%)	80	23	9	0	0

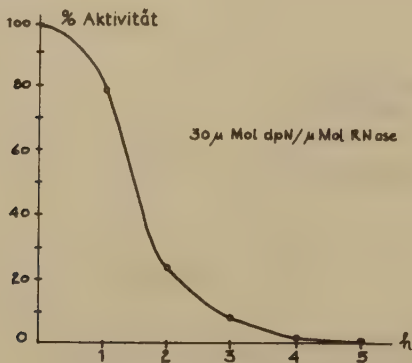
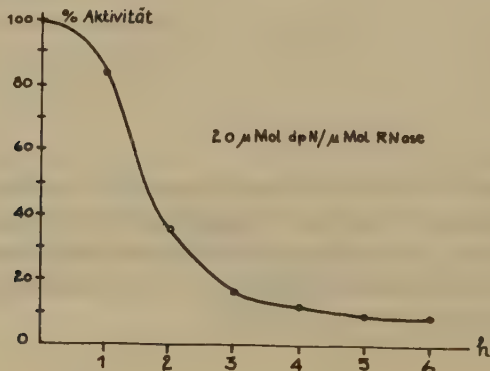


Tabelle: (20 μ M dpN/ μ M RNase)

Zeit (h)	1	2	3	4	5	6
Aktivität (%)	84	39	21	17	12	10



Hier ergibt sich also etwa das gleiche Bild wie bei steigender Konzentration an diazotiertem p-Nitranilin: zunächst schnelle Reaktion, dann fast konstante Restaktivität. Die Reaktion ist nach 4 Stunden praktisch beendet. Alle ferneren Versuche wurden daher 4 Stunden laufen gelassen.

"Alles oder Nichts"-Gesetz

Wie erwähnt, fällt die Ribonuklease bei der Reaktion mit diazotiertem p-Nitranilin aus. Es wurde geprüft, ob für diese Reaktion ein "Alles oder Nichts"-Gesetz gilt, d.h. ob der gekuppelte Niederschlag vielleicht völlig inaktiv war, während die in Lösung verbliebene (vielleicht ungekuppelte) Ribonuklease eventuell alle Restaktivität enthielt.

Beim Fällern mit Trichloressigsäure zeigte sich jedoch, daß auch die in Lösung verbliebene Ribonuklease gefärbt war, was schon auf deren Kupplung hindeutete, aber noch durch Absorptionseffekte bedingt sein konnte. Daher wurde der bei der Reaktion entstehende Niederschlag abzentrifugiert, die Aktivität des Überstandes, die Gesamtaktivität und (durch Suspendieren des Niederschlags in der gleichen Menge Phosphatpuffer) die Aktivität des Niederschlags gemessen. Das Ergebnis war, daß sowohl Überstand wie Niederschlag noch teilweise aktiv waren und ihre Aktivitäten zusammen die Gesamtaktivität ergaben. Die aus der Suspension gemessene Aktivität ist somit eine mittlere Aktivität, von zahlreichen mehr oder minder aktiven Molekeln bewirkt.

Tabelle zu diesen Versuchen:

	RNase + 10 μ M dpN	RNase + 30 μ M dpN
Gesamtaktivität	55 %	2,3 %
Überstand	32 %	0,6 %
Niederschlag	29 %	1,8 %

b) Quantitative Bestimmung der gekuppelten Aminosäuren
(hauptsächlich des Histidins) in der Ribonuklease

Um die oben erwähnte Beziehung zwischen Aktivität und Verlust eines Histidins im Ribonukleasemolekül auch mit unseren Mitteln finden zu können, wurden nun Histidinanalysen durchgeführt. Gekuppelte Ribonuklease wurde hydrolysiert und das Histidin nach folgenden drei Methoden bestimmt:

1. Optisch-analytisch nach NEWMAN und TURNBULL
2. Optisch-mathematisch nach TABACHNIK und SOBOTKA (neben Tyrosin)
3. Mit Hilfe des automatischen Aminosäureanalysators nach STEIN und MOORE (neben Lysin und Arginin)

Die beiden ersten Verfahren bedürfen der Erläuterung, während das dritte wohl selbstverständlich ist.

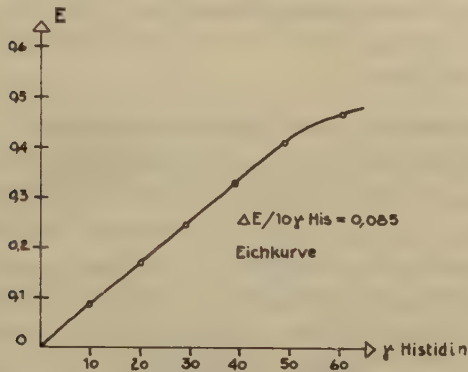
1. Verfahren nach NEWMAN und TURNBULL

Diese Methode zur Histidinbestimmung ist sehr elegant, genau und spezifisch. Sie beruht auf der Bildung eines Farbstoffes zwischen Jod und Pyridin bei p_H 11-12, dessen Bildung von Histidin katalysiert wird. Die genaue Reaktionsweise ist noch nicht aufgeklärt. Selbst nahe Verwandte des Histidins (Acetylhistidin, Carnosin, Imidazol) reagieren nicht, ebenso nicht Proteine und Peptide, selbst solche mit aminoendständigem Histidin, wie Glucagon. Allerdings reduzieren manche Ionen die Farbintensität, ebenso Tyrosin und Tryptophan, die daher abgetrennt werden müssen. Histidinderivate, die ebenfalls reagieren, sind Histamin und Histidin-Methylester.

Eichkurve des Verfahrens

Die Steigung der Eichkurve wurde zwar als ein wenig geringer bestimmt als aus der Eichkurve der Autoren ersichtlich ($E=0,085/10$ statt $0,10/10$). Doch ist das Verfah-

ren sehr genau reproduzierbar. Der Fehler liegt unter 5 %, die untere Erfassungsgrenze ist sehr niedrig (bei etwa 2-4 μ). Der obere Grenzbereich der Bestimmung liegt bei etwa 55 μ .



Eichtabelle:

	E		E		E
5 :	0,042	30 :	0,243	50 :	0,430
10 :	0,085	40 :	0,363	60 :	0,467
20 :	0,175				

Um das Histidin der hydrolysierten Ribonuklease von störenden Begleitstoffen, (besonders Tyrosin) zu befreien, wurde bei p_H 6,5 elektrophoriert, die durch Vergleiche markierte Histidin-Bande ausgeschnitten, eluiert und das Eluat analysiert.

Ergebnisse (Gesamt-His-Gehalt d. RNase: 4 Reste)		
Mol dpN/ Mol RNase	Hemmung (%)	Mol.verlor. His
0	0	0,6
5	17	0,85
10	48	1,15
15	83	1,35
20	93	1,6
30	100	2,05

Die ungekuppelte Ribonuklease ergab 0,6 Mol Histidinverlust, was wohl mit auf den Feuchtigkeitsgehalt des Proteins zurückzuführen sein dürfte. Entsprechende Korrekturen sind bei den folgenden Analysen vorzunehmen. Zieht man diese 0,6 Mol überall ab, so kommt man bei 100%iger Hemmung dem Wert von einem Histidin-Verlust (wie er bei Vorhandensein eines Histidins im aktiven Zentrum zu erwarten wäre) recht nahe.

2. Die optische Methode nach TABACHNIK und SOBOTKA

Die Methode ist eine Variation der sogenannten "2-Wellenlängen-Methode". Sie besteht darin, daß zwei verschiedene Substanzen in einem Gemisch oder höheren Verband (Proteine) nebeneinander bestimmt werden können, und zwar durch Messung ihrer Extinktion bei 2 genügend voneinander entfernten Wellenlängen eines günstig gelegenen Wellenlängenbereichs. Günstig gelegen heißt hier, daß bei jeder zu messenden Wellenlänge eine der beiden zu bestimmenden Substanzen eine möglichst hohe, die andere eine möglichst niedrige Wellenlänge haben sollte. Von der gut getroffenen Wahl dieses Wellenlängenbereichs hängt in hohem Maße die Genauigkeit der Methode ab. Außerdem dürfen naturgemäß in dem Gemisch oder höheren Verband möglichst keine anderen in diesen Wellenlängenbereich absorbierenden Verbindungen vorhanden sein, da sonst ebenfalls die Fehlergrenze der Methode heraufgesetzt wird. Die Methode beruht auf der Erfüllung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes durch die betreffenden Substanzen, das meist in seiner einfachsten Form:

$$E = \epsilon \cdot c \quad \left\{ \begin{array}{l} E = \text{optische Dichte} \\ \epsilon = \text{Extinktionskoeffizient} \\ c = \text{Konzentration} \end{array} \right\}$$

angewandt wird (d.h. die Schichtdicke wird $d = 1$ gesetzt).

Bei Anwendung auf ein Zweikomponentensystem entstehen so zwei Gleichungen mit zusammen zwei Unbekannten, die sich auf bekannte Weise einfach lösen lassen.

$$E_{\lambda 1} = \epsilon_{\lambda 1}^1 \cdot c_1 + \epsilon_{\lambda 1}^2 \cdot c_2$$

$$E_{\lambda 2} = \epsilon_{\lambda 2}^1 \cdot c_1 + \epsilon_{\lambda 2}^2 \cdot c_2$$

Die beiden Extinktionen E_1 und E_2 ergeben die jeweiligen Messungen bei den genannten Wellenlängen, die Extinktionskoeffizienten sind Konstanten. Somit errechnen sich die Konzentrationen mühelos aus den obigen Gleichungen.

Erste Anwendung und Vorbild für alle Abwandlungen dieser Technik ist wohl die gleichzeitige Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan nebeneinander im Gemisch und in Proteinen, wie sie z.B. von BEAVEN und HOLIDAY ⁶⁴⁾ ausführlich beschrieben und erläutert wird. Neuere Anwendungen dieser Methode sind von FRITZ und ZAHN ⁶⁵⁾ sowie von TSANEV und MARKOV ⁶⁶⁾ beschrieben worden. Von TABACHNIK und SOBOTKA wird sie nun zur gleichzeitigen Bestimmung von gekuppeltem Tyrosin und Histidin in Azoproteinen verwandt. ⁴⁸⁾ Die von den Autoren gewählten Wellenlängen sind 460 und 500 m μ ; sie wurden ausgewählt, um Störungen durch gekuppeltes Lysin möglichst auszuschließen. Das von den Autoren dargestellte Lysin-analoge Pentazen hat in diesem Bereich zwar noch eine merkliche, aber sich quantitativ nicht mehr störend auswirkende Konzentration. Durch Bestimmung des Azofarbstoff-Gehalts einer vorgegebenen Lösung bewiesen die Autoren die Anwendbarkeit der Methode auf Aminosäuregemische. Ihre Anwendbarkeit auf Proteine wurde durch vollständigen enzymatischen Abbau von Serumalbumin zu in Trichloressigsäure löslichen Peptiden bewiesen. Bestimmungen des Farbstoffgehalts die-

ser Peptide und von intaktem Protein ergaben keine nennenswerten Unterschiede, so daß die Methode also dahingehend vereinfacht werden konnte, das Azoprotein in 0,1 n Natronlauge zu lösen, die Extinktion bei den genannten zwei Wellenlängen möglichst genau zu bestimmen und durch Einsetzen der gemessenen Werte in die entsprechenden zwei Gleichungen (s.oben) die Mengen an gekuppeltem Histidin und Tyrosin zu errechnen. Die Autoren fanden mit Hilfe dieser Methode (wie oben schon berichtet) daß, wenn die Kupplungsreaktion an acetyliertem Protein im Bereich von p_H 9 ausgeführt wird, 90-95 % des Diazoniumsalzes als Azotyrosin bzw. Azohistidin gebunden werden (Vergleich des Arsengehalts des Azoproteins mit dem durch die optische Methode gewonnenen Werten).

Diese Methode konnte von uns zunächst nicht übernommen werden, da sich bei der dazu notwendigen Bestimmung der Extinktionskoeffizienten ergab, daß das Pentazen der ϵ -Aminocaprönsäure mit diazotiertem p-Nitranilin in diesem Gebiet sehr stark absorbiert (sogar stärker als die zu bestimmenden Farbstoffe). Dies war einer der Gründe, warum wir (nach vorübergehender Anwendung von diazotierter Arsanilsäure, wie in der Originalmethode) später zu diazotierter Sulfanilsäure übergingen.

Die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe der diazotierten Sulfanilsäure werden (mit Ausnahme des Farbstoffs des Lysin-Analogen) von TABACHNIK und SOBOTKA ebenfalls angegeben, so daß sie von uns direkt übernommen werden konnten. Eine kurze Bestimmung der Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs vom α -Desamino-Lysin (die lediglich beweisen sollte, daß dieser Farbstoff in dem gewählten Wellenlängenbereich nicht stört) machte die Methode für unsere Zwecke voll verwendungsfähig. ($\epsilon_{460} = 2\ 850$ $\epsilon_{500} = 320$).

Ergebnisse:

Versuche mit d A S (diaz. Arsanilsäure)

<u>Mol d A S</u>	<u>Hemmung (%)</u>	<u>Mol gek.His</u>	<u>Mol gek. Tyr</u>
Mol RNase			
50	47	0.64	2.41
100	68	0.55	3.08
100	63	0.53	2.66
200	82	0.57	3.28

Die Hemmergebnisse sind also im Vergleich zu Versuchen mit diazotiertem p-Nitranilin bei der diazotierten Arsanilsäure wesentlich schlechter. Das mag an der größeren Raumerfüllung der Arsanilsäuregruppe liegen, die einen Angriff auf das Proteinmolekül sterisch behindert. Eine Rolle könnte auch der für dieses Diazoniumsalz nicht ausreichend alkalische p_H des Puffers (Phosphatpuffer p_H 7,8) spielen. Aus diesen Gründen gingen wir zu diazotierter Sulfanilsäure und Boratpuffer p_H 8,6 über, der bei den späteren Experimenten mit LDH durch Pyrophosphatpuffer gleichen p_H 's ersetzt wurde, da sich die LDH in diesem Puffer als wesentlich stabiler erwies.

Die Ergebnisse der Kupplung zeigen indessen drei reaktionsfähige Tyrosingruppen, deren Betrag sich auch bei extremer Erhöhung der Diazoniumsalzmenge nicht wesentlich erhöht. Dieser Befund stimmt gut mit den oben zitierten Arbeiten von TANFORD überein, wonach die Ribonuklease drei reaktionsfähige titrierbare Tyrosinreste enthält, während die drei anderen im Innern des Moleküls verborgen sind ²⁰⁾ ²¹⁾. Der Betrag des gekuppelten Histidins liegt unter eins, was auf höchstens eine reaktionsfähige Gruppe dieser Art hindeutet.

Versuche mit diazotierter Sulfanilsäure (d SF)

<u>Mol d SF</u>	<u>Hemmung (%)</u>	<u>Mol gek.His</u>	<u>Mol gek. Tyr</u>
Mol RNase			
5	37	0.42	2.20
10	80	0.65	2.67
20	96	0.88	4.30

Mit dem kleineren Molekül und dem reaktionsgünstigeren Puffer wird also die Zahl von drei gekuppelten Tyrosinresten mit höherem Überschuß an Diazoniumverbindung überschritten. Analoge Ergebnisse berichteten letztlich CHA und SCHERAGA von Jodierungsversuchen der Ribonuklease ⁶⁷⁾, wo drei Tyrosinreste rasch und einer der "anormalen" Tyrosinreste langsam reagieren sollen. Andererseits wird hier der Betrag von einem gekuppelten Histidin schon fast erreicht.

3. Histidinbestimmung mit Hilfe des automatischen Aminosäureanalysators nach HIRS, STEIN und MOORE

Bei dieser Analysenmethode wird ebenfalls (wie bei der Methode 1) der Betrag an ungekuppelten (freien) Aminosäuren bestimmt und daraus auf den Gehalt des Proteins an gekuppelten Aminosäuren geschlossen. (Der Gesamtgehalt an Aminosäuren ist ja bei der Ribonuklease bekannt). Die Methode ist naturgemäß als Differenzbestimmung nicht so genau wie eine direkte Bestimmungsmethode. Die Analysen wurden (nach Hydrolyse der Ribonuklease mit 6 nHCl) im hiesigen Institut freundlicherweise von Herrn Dr. Determann und Fräulein Lünse ausgeführt. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

<u>Mol Diaz. Salz</u>	<u>Hemmung (%)</u>	<u>Mol ungek.His</u>	<u>Mol ungek.Lys</u>	<u>Mol Arg</u>
Mol RNase				
0	0	3,2	11,7	5,2
theo- 0	0	4	10	4
ret. 15 (dpN)	84	2,7	2,6	5,3
25 (d SF)	100	1,2	2,2	-

Die Bestimmungen von Lysin und Arginin zeigen, daß die letztere Aminosäure wohl nicht reagieren dürfte, während die Reaktion des Lysins sich sehr deutlich manifestiert. Von den Histidinwerten stimmt der erste etwa mit den durch die anderen Verfahren gewonnenen Werten überein, während der zweite aus dem Rahmen fällt.

Spektrum von gekuppelter Ribonuklease

Als Abschluß der Versuche mit Ribonuklease wurde das Spektrum von mit diazotiertem p-Nitranilin gekuppelter Ribonuklease in Natronlauge und Methanol aufgenommen (in destilliertem Wasser ist sie zuwenig löslich). Es ergaben sich in Natronlauge Maxima bei 512 sowie 395 und 335 m μ , während in Methanol nur ein Maximum bei 400 m μ auftauchte.

2.) Versuche mit LDH aus Schweineherz

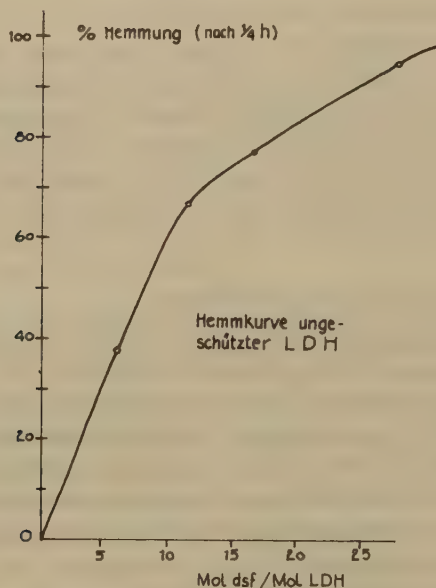
Es ergab sich zu Beginn der Versuche, daß Boratpuffer nicht recht geeignet für Versuche mit LDH war, (zu schnelle Aktivitätsabnahme). Daher zogen wir Pyrophosphatpuffer ($\frac{m}{10}$, p_H 8,6) heran. Es wurde hier anschließend mit diazotierter Sulfanilsäure gearbeitet; einer der Gründe dafür war, daß die für spätere Markierungsversuche benutzte radioaktive diazotierte Sulfanilsäure relativ einfach herstellbar ist.

a) Hemm-Kurve ungeschützter LDH

Um festzustellen, ob das Enzym überhaupt von Diazoniumsalzen gehemmt wird, unternahmen wir Vorversuche. Die Hemmwirkung verschiedener zugesetzter Beträge an Diazoniumsalz ist in der folgenden Tabelle aufgezeichnet. Die Kurve steigt zunächst etwa gradlinig an, um dann später abzuknicken.

Tabelle:

<u>Mol d Sf</u>	<u>Hemmung (%)</u>
Mol LDH	
5	38
10	67
15	78
25	94



Da bereits bekannt war, daß die LDH "aktive" SH-Gruppen hat, lag es zunächst nahe, zu vermuten, daß die Reaktion dieser SH-Gruppen Ursache des Aktivitätsverlustes sei. Wir versuchten daher, den zunächst in der Kälte wahrscheinlich entstehenden Diazothioäther mit Resorcin zu spalten, die SH-Gruppen auf diese Weise wieder freizusetzen und so das Enzym zu reaktivieren. Dazu mußte vorher bewiesen werden, daß das zugesetzte Resorcin selbst die LDH nicht hemmt. Dieser Beweis wurde erbracht: auch nach Stunden zeigte sich auf Resorcinzugabe keine merk-

liche Aktivitätsminderung. Eine Reaktivierung mit Resorcin mißlang jedoch, was die Vermutung zuließ, daß neben den SH-Gruppen auch noch andere funktionelle Gruppen beteiligt sein dürften. Das Diazoniumsalz war jedenfalls recht fest gebunden, da auch nach tagelanger Dialyse (wie sie nach GELEWITZ⁷⁰⁾ zu völliger Entfernung adsorptiv gebundenen Diazoniumsalzes erforderlich ist), keine Reaktivierung oder Entfärbung der LDH zu bemerken war.

Für die folgenden Versuche war es vielfach notwendig, Konzentrationsbestimmungen von Azoproteinlösungen vorzunehmen. Da die normalen Proteinbestimmungen infolge der Färbung der Proteine versagten, mußten wir eine abgeänderte Bestimmungsmethode ausarbeiten. Bei der Biuretbestimmung nach WEICHSELBAUM wurde ein zusätzlicher Blindwert (der die Färbung des Azoproteins in NaOH berücksichtigen half) gemessen und abgezogen. Das Verfahren zeigte sich bei Kontrollversuchen mit gefriergetrockneten Azoproteinen als ebenso genau wie die Originalmethode.

b) Schutz der LDH mit dem SH-Reagenz PCIMS

Da die Hemmwirkung von Diazoniumsalzen auf LDH nun bestätigt war, galt es zunächst, die aktiven SH-Gruppen wirksam gegen das Reagenz zu schützen, bevor Aussagen über die Beteiligung weiterer Gruppen gemacht werden konnten. Es wurde von uns p-Chloromercurisulfonat für diesen Zweck gewählt, da bei diesem Reagenz einerseits die Dissoziationskonstante der S-Hg-Bindung sehr klein ist (vgl. HgS), es andererseits aber mit Hilfe von KCN komplex gebunden, von den SH-Gruppen wieder abgelöst und die LDH auf diese Weise reaktiviert werden kann.

Die Schutzwirkung des Reagenz' wurde durch Bestimmung der SH-Gruppenzahl von gekuppelter LDH nach der KCN-Reaktivierung und Vergleich mit der SH-Zahl von reaktivierter, aber nicht gekuppelter LDH geprüft.

Eichung der Methode an SH-Glutathion (GSH)

In der Originalmethode von BOYER wird mit Mercuribenzoat gearbeitet und ein ΔE für die SHg-Bindung von $6 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ angegeben. Als Puffer ist am günstigsten Phosphat p_H 7,2- Die Methode wurde an GSH nachgeeicht. Dabei muß nach Ansetzen der Lösung rasch gemessen werden, denn der Extinktionskoeffizient sinkt langsam ab, da Autoxydation zum GS-SG eintritt.

Eichtabelle:

PCLMB		PCLMS	
10^{-7} Mol GSH	ΔE	10^{-7} Mol GSH	ΔE
0,3	0,179	0,2	0,116
0,6	0,358	0,4	0,230
0,5	0,298	0,6	0,465
1	0,598	1	0,585

Die ermittelten ΔE -Werte betragen also $5,98 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ bzw. $5,85 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$.

Reaktivierung nach Schutz mit PCLMS

Es zeigte sich, daß bei zu langem Einwirken des schützenden PCLMS auf die LDH irreversible Inaktivierung erfolgte, die wohl auf Strukturveränderungen zurückzuführen ist, wie sie von Reagentien dieser Art mehrfach berichtet wurde, z.B. 71). Es mußten daher Versuche über die günstigsten Reaktionsverhältnisse angestellt werden, die folgende Bedingungen erfüllen sollten.

1. Völlige reversible Inaktivierung der LDH und damit vollständiger Schutz der SH-Gruppen
2. Genügend lange Reaktionszeit für die Einwirkung der Diazoverbindung
3. Möglichst kurze Gesamteinwirkungszeit des PCLMS, um die irreversible Denaturierung gering zu halten.

Die Versuche ergaben als Optimum eine Einwirkungszeit von 1 1/2 bis 1 3/4 Stunde für das PCLMS. (Nach einer Stunde wurde fortan das Diazoreagenz zugegeben, das eine halbe Stunde einwirken durfte.) Nach weniger als einer Stunde zeigte sich noch Restaktivität (nach einer halben Stunde z.B. noch 10 bis 15 %) während nach 2 1/2 bis 3 Stunden nur noch 20 bis 40 % der Ausgangsaktivität wieder erhalten werden konnte. (Über 60 % Denaturierung).

SH-Gruppenbestimmung an geschützter gekuppelter und ungekuppelter LDH

Die Bestimmung wurde analog der Veröffentlichung von G. PFLEIDERER, D. JECKEL und Th. WIELAND ⁶⁸⁾ vorgenommen, nachdem das Protein bzw. das Azoprotein in Harnstoff entfaltet worden war.

Die Kupplung der LDH vor der SH-Gruppenbestimmung wurde auf folgende Weise vorgenommen

1. Einstündige Einwirkung von PCLMS, dann
2. halbstündige Einwirkung des Diazoniumsalzes
3. Abfangen überschüssigen Diazoniumsalzes mit Resorcin, damit es nicht die in Stufe 4 freiwerdenden SH-Gruppen angreift (Resorcin selbst läßt die LDH-Aktivität unbeeinflusst, s.oben).

4. Freimachen der SH-Gruppen mit KCN. Die KCN-Lösung wurde mit Hilfe von festem primären Kaliumphosphat auf etwa p_H 8,6 eingestellt, um keine Alkalidenaturierung zu erzeugen.

5. Drei- bis viertätige Dialyse gegen NaCl.

Das ungekuppelte Protein wurde genau der gleichen Prozedur unterworfen und gleichzeitig in demselben Puffer mitdialysiert ($m/10$ NaCl, auf p_H 7-7,5 eingestellt, zuletzt Phosphat p_H 7,2).

Ergebnis der SH-Bestimmung war ein Wert von 7,8 Mol SH pro Mol LDH für das ungekuppelte und 8,05 Mol pro Mol

LDH für das gekuppelte Protein. Es wurde zwar nicht die ganze Zahl von 14 SH-Gruppen wiedergefunden; aber da das nicht gekuppelte Protein noch 78 % der Ausgangsaktivität zeigte und außerdem nur eine etwa gleich große Anzahl von Rest-SH-Gruppen hat, können zumindestens nicht hauptsächlich essentielle SH-Gruppen von der Kupplung betroffen sein. Das Ergebnis zeigt die gute Schutzwirkung des PClMS unter den genannten Bedingungen.

c) Aktivitätsverlauf der LDH bei der Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure nach vorherigem Schutz mit PClMS

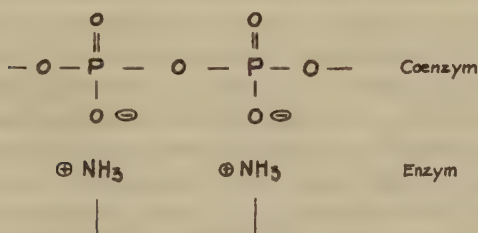
Da durch den obigen Versuch eine ausreichende Schutzwirkung des PClMS erwiesen ist, konnte nun der Einfluß des Diazoniumsalzes auf die kupplungsfähigen aktiven Gruppen des LDH-Moleküls außer den SH-Gruppen untersucht werden.

Tabelle:

<u>μM dSf</u>	<u>% Hemmung</u> (nach vorher. Schutz)
μ M LDH	
1	0
2	11
5	47
10	67
25	98

Die Tabelle zeigt etwa den gleichen Verlauf wie die Hemmkurve ohne vorherigen Schutz der LDH (allerdings nach 10-15 Minuten Einwirkungszeit). Das zeigt, daß das Diazoniumsalz wohl in der Hauptsache mit anderen aktiven Gruppen auch in der ungeschützten LDH reagieren dürfte. Zum andern war nun klar, daß andere, kupplungsfähige Gruppen in der LDH für deren Aktivität mitverantwortlich sind. In Frage kommen hauptsächlich (s.oben) Lysin, Tyrosin und Histidin. Hier ist es sehr interessant, die augenblicklich vertretene Theorie der Bindung des Coenzyms an

das Enzym zu erwähnen, die fordert, daß die zwei negativ geladenen Phosphatgruppen des Coenzym an zwei positive Gruppen des Proteins, z.B. zwei ϵ -Aminogruppen des Lysins, gebunden und das Coenzym durch Neutralisierung seiner Ladung aktiviert wird.



Stimmt diese Theorie, und es spricht Vieles dafür, so könnte Lysin (einer der Hauptkuppler, wenn nicht die eigentlich mit Diazoniumsalzen reagierende Gruppe) wesentlich am Reaktionsmechanismus der LDH mitbeteiligt sein. Seine Reaktion mit anderen Gruppen sollte also die LDH entscheidend hemmen.

3.) Anwendung von radioaktiver diazotierter Sulfanilsäure

a.) Messung der Einbaurate

Um nun unserem eigentlichen Ziel, markierte Bruchstücke aus dem aktiven Zentrum der LDH zu gewinnen, näher zu kommen, begannen wir, radioaktiv markierte (S^{35} -) diazotierte Sulfanilsäure zu verwenden. Diese bot außerdem zunächst einmal die Gelegenheit, festzustellen, wieviel Diazoniumsalz überhaupt in das LDH-Molekül eingebaut wird, und zu vergleichen (mittels der optischen Methode von

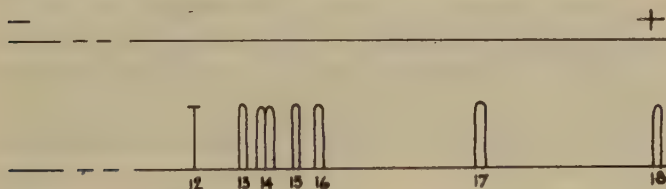
TABACHNIK und SOBOTKA) wieviel davon auf Tyrosin und Histidin-Kupplung entfällt. Zu diesem Zweck mußte natürlich zuerst die spezifische Radioaktivität der diazotierten Sulfanilsäure genau ermittelt werden. Das geschah durch Ansetzen einer Lösung von radioaktiver diazotierter Sulfanilsäure in Wasser, kontrolliertes Verdünnen, Aufbringen einer adäquaten Flüssigkeitsmenge auf ein Aluminium-Zähl-schälchen, Abdunstenlassen des Wassers bei 60° C und Messung der Radioaktivität im 2- π -Zähler. Die Radioaktivität des Azoproteins wurde auf die gleiche Weise bestimmt, nur daß hier zum Lösen $\frac{m}{50}$ Natronlauge verwandt wurde. Es ergab sich, daß bei Verwendung eines zehnfachen Überschusses an Diazoniumsalz (wie wir ihn bei allen radioaktiven Einbauversuchen verwandten und der etwa 70 % Hemmung entspricht - s. Tabelle -) 4,3 Mol diazotierte Sulfanilsäure pro Mol LDH eingebaut werden. Die optische Methode ergab mit derselben LDH 2,5 Mol gekuppeltes Tyrosin plus 0,6 Mol gekuppeltes Histidin, zusammen 3,1 Mol. 1,2 Mol entfallen also auf die Lysinkupplung. (Ein früherer Versuch mit normaler diazotierter Sulfanilsäure und LDH hatte bei 25fachen molaren Überschuß und völliger Hemmung folgende Werte ergeben: 1,9 Mol gekuppeltes Histidin + 6,0 Mol gekuppeltes Tyrosin). Der Prozentsatz der Lysinkupplung ist also etwa der gleiche wie der von TABACHNIK und SOBOTKA am Rinderserumalbumin festgestellte.

b.) Verdauungsversuche

Zweck dieser Versuche war es, eine möglichst günstige proteolytische Abbaumethode für das markierte Azoprotein zu finden. Es sollte vermieden werden, daß allzu viele und allzu kleine, schwierig zu trennende und zu reinigende Peptide entstanden. Lieber sollte die Isolierung von grösseren, aber wenigen Peptiden versucht werden, die später weiter abgebaut werden konnten.

Versuch mit Trypsin

Die Verdauungsversuche wurden in NH_4HCO_3 -Puffer gemacht, der bei späterer Gefriertrocknung der Peptidlösungen flüchtig ist und so die anschließenden Reinigungsversuche nicht stört. Es wurde wenig (1-2 Tropfen) Toluol zugegeben, um bakterielle Zersetzung des Ansatzes zu vermeiden. außerdem wurde geschüttelt, um die Reaktion zu beschleunigen (das Azoprotein lag ja in Suspension vor). Bei Zusatz von Trypsin war die Reaktion (verfolgt durch das Klarwerden der Lösung) recht langsam, nach etwa 48 Stunden erst war sämtliches Azoprotein verdaut. Nach Ausfällung allen Proteins (Trypsin) durch 15minütige Hitzedenaturierung wurde der sich bildende Niederschlag durch Zentrifugieren und anschließende mehrmalige Filtration sorgfältig entfernt und sodann die resultierende Lösung gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde mit wenig Wasser aufgenommen und bei pH 6,5 elektrophoriert. Dabei zeigte sich nach einstündiger Elektrophorese und Besprühen mit Ninhydrin 16 Banden, die folgende Verteilung hatten



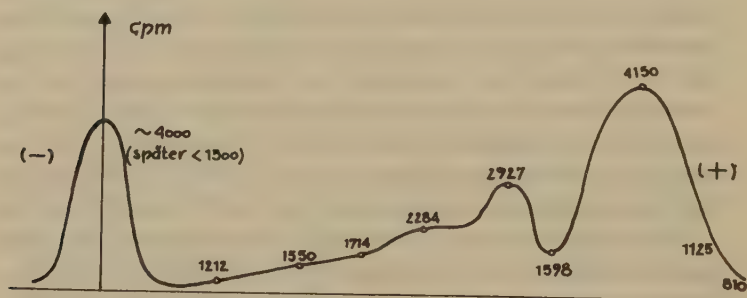
Banden 1 - 11

(keine Radioaktivität)

(-) Einstunden - Phorogramm

Mit Hilfe eines Durchlaufzählers wurden zwei radioaktive Banden identifiziert, die sich auch schon auf dem Phero-

gramm durch ihre schwach gelbe Farbe angezeigt hatten. Außerdem war am Start einige Radioaktivität. Die eine radioaktive Bande (15) war schwach ninhydrinpositiv, die andere (16) negativ. Der Verlauf der Radioaktivität bot folgendes Bild: (Durchlauf- und 2 π -Zähler).



Die am Start vorhandene Radioaktivität (die bei späteren Versuchen mit sorgfältig gereinigten Lösungen verschwindend gering war und im sauren Pherogramm ebenfalls liegenblieb) dürfte von geringen Mengen unverdauten Azoproteins herrühren, denn bei Vergleichselektrophoresen blieb dieses (wohl infolge seiner Unlöslichkeit) ebenfalls am Start liegen.

Chymotrypsin-Versuch

Der Zusatz dieser Protease zum Verdauungsansatz zeigte überhaupt keine merkliche Wirkung, noch nach 3 Tagen war sehr viel Azoprotein vorhanden. Auch das nach dem oben angegebenen Verfahren gewonnene Peptidgemisch zeigte nur geringe Radioaktivität (die Lösung war nur ganz schwach gelblich). Nach der einstündigen Elektrophorese konnten

mittels des Durchlaufzählers zwei sehr schnell in Richtung Anode gewanderte Banden registriert werden, die ninhydrin-negativ waren. (Eventuell radioaktive Verunreinigungen)

Nagarse-Versuch

Diese japanische Protease aus Bakterien, identisch mit dem aus *B. subtilis* gewonnenen Subtilisin, spaltet recht unspezifisch und sollte daher unser Azoprotein wesentlich rascher verdauen als die spezifischeren in den vorhergehenden Versuchen angewandten Proteasen. Tatsächlich wurde bei Zusatz von Nagarse die Lösung innerhalb von 6-8 Stunden völlig klar. Das Peptidgemisch zeigte bei neutraler Elektrophorese im Durchlaufzähler 6 zum Teil ninhydrinpositive, recht starke radioaktive Banden.

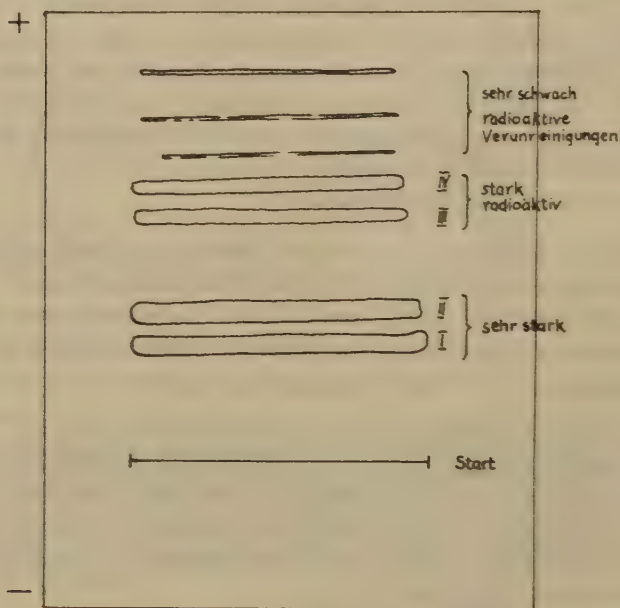
Da also beim Trypsin die relativ günstigsten Bedingungen ermittelt worden waren (mittlere Abbaugeschwindigkeit, wenige radioaktive Banden), wurde diese Protease in der oben angegebenen Weise bei allen ferneren Abbauprobeversuchen herangezogen.

Alle nach dem proteolytischen Abbauprobeverfahren und anschließender Elektrophorese entdeckten Banden wanderten anodisch. Dies wird verständlich, wenn man sich überlegt, daß einerseits durch Lysinkupplung basische Gruppen verschwinden, andererseits durch das Reagenz die stark saure Sulfogruppe eingeführt wird.

c.) Reinigung des mit Trypsin gewonnenen Peptidgemisches

Um das beim Trypsinabbau gewonnene Peptidgemisch zu reinigen, wurde es zunächst 5 Stunden bei p_H 6,5 der Elektrophorese unterworfen (M. und N.-Papier 2214 ff, doppelt gewaschen). Die Wanderung der radioaktiven Banden konnte bei größeren Mengen verdauten Azoproteins auf Grund ihrer

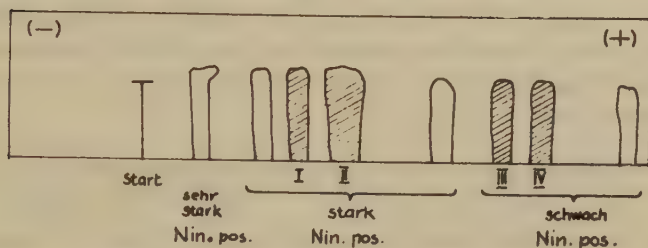
gelben Farbe mit dem Auge verfolgt werden. Dennoch wurde anschließend 2-3 Tage autoradiographiert, um auch etwa vorhandene schwächere Banden zu entdecken. Der entwickelte Röntgenfilm zeigte, daß sich die nach einstündiger Elektrophorese im Durchlaufzähler gefundenen zwei Banden jeweils noch einmal in je zwei Banden aufgespalten hatten, so daß sich nun folgendes Bild bot:



6-Stunden-Pherogramm des mit Trypsin gewonnenen Peptidgemisches

(p_H 6,5; 1500 V/60 mA, Kühlung Stufe 4)

Die Verteilung der mit Ninhydrin gefundenen Peptide war nach 6 h wie folgt:

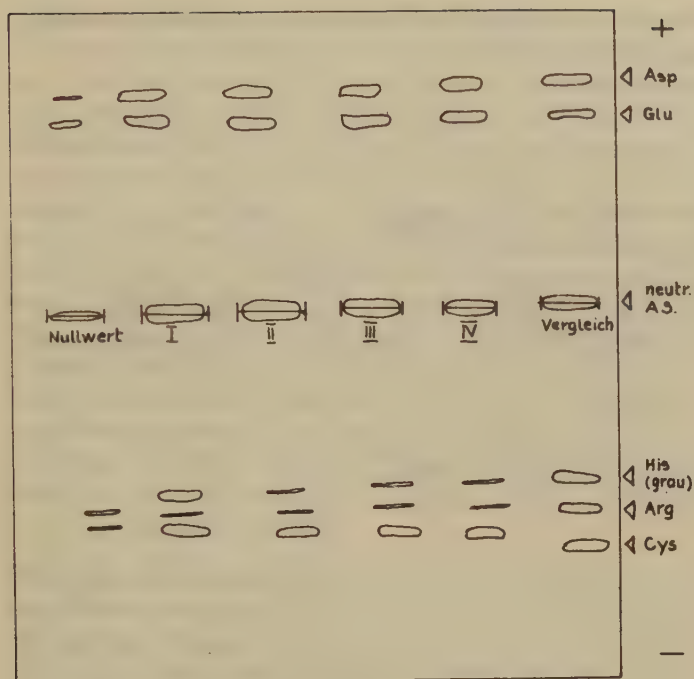


Die Banden I - IV wurden nun durch Auflegen des Röntgenfilms auf das Elektrophoreseblatt und Durchstechen von Film und Blatt mit einer Nadel genau markiert, ausgeschnitten und mit wenig NH_4HCO_3 -haltigem Wasser eluiert. Es mußte nun mit Hilfe der Chromatographie gezeigt werden, daß sie einheitlich seien. Dazu galt es zunächst ein geeignetes Lösungsmittelgemisch zu finden, da es sich zeigte, daß die im Hause meistens zu Peptidtrennungen verwandten Lösungsmittel (besonders H, in dem alle Banden am Start liegen blieben), nicht geeignet waren. Mit Hilfe von in Lösung dargestellten Aminosäurefarbstoffen der diazotierten Sulfanilsäure fanden wir schließlich ein von KAPLAN für Nukleotidtrennungen benutztes Lösungsmittelgemisch, das sich als einigermaßen brauchbar erwies. (Äthanol/Wasser/Essigsäure). Sehr gut brauchbar ist es für die Trennungen der Aminosäurefarbstoffe voneinander; die Peptidbanden hatten jedoch R_F -Werte von 0,80-0,88, was eine sichere Reinigung nicht unbedingt garantiert. In einem später verwandten Lösungsmittelgemisch konnten eben-

falls die Aminosäurefarbstoffe gut getrennt werden, die Peptidbanden liefen jedoch praktisch mit der Lösungsmittelfront. Große R_F -Werte hatte in diesem Lösungsmittelgemisch auch der Farbstoff des Lysin-Analogen. In dem ersten angegebenen Gemisch erwiesen sich die mittels Elektrophorese isolierten Banden als einheitlich. Es konnte keinerlei Aufspaltung mittels Autoradiographie nachgewiesen werden.

d) Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung der isolierten markierten Peptide

Da nun Einheitlichkeit der isolierten Peptide als wahrscheinlich anzunehmen war, wurde mit der Ermittlung ihrer Aminosäurezusammensetzung begonnen. Die mit NH_4HCO_3 -haltigem Wasser aus den Chromatogrammen eluierten Banden wurden gefriergetrocknet und dann der Hydrolyse mit 6-normaler Salzsäure bei 110°C unterworfen. (Als Blindwert wurde ein gleichgroßer Streifen des Papiers eluiert. Nach zweimaligem Abdampfen der Salzsäure und Wiederaufnehmen mit Wasser wurde ein Teil des Hydrolysats bei $\text{pH } 6,5$ elektrophoriert. Die sich nach dem Besprühen mit Ninhydrin ergebende Aminosäureverteilung hatte folgendes Bild:



Pherogramm des Peptidhydrolysats bei p_H 6,5

Die Aminosäureverteilung aller vier Banden war also etwa gleich, nur daß in Bande I relativ stark Histidin auftrat, das die anderen nur in Spuren zeigten. Wesentlich stärker als der Blindwert waren vertreten: Lysin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, die neutralen Aminosäuren und bei Bande I noch Histidin. Das Auftreten von Lysin ist plausibel, da infolge der Spaltung mittels Trypsin (das nur Lysyl- und Arginyl-Bindungen spaltet) und das Fehlens von Arginin jedes Peptid mindestens einen ungekuppelten Lysinrest haben muß.

Daraus ging eindeutig die Anwesenheit von Leucin und Alanin sowie die Abwesenheit von Phenylalanin hervor. Tyrosin war sehr schwach in allen vier Hydrolysaten anwesend. Geklärt werden mußte noch der Block der kleinen und sauren Aminosäuren, sowie die Einheitlichkeit des Valinflecks, da Valin in Lösungsmittel H nicht von Methionin getrennt werden kann. Die Bande der neutralen Aminosäuren wurde daher aus dem oben erwähnten p_H 6,5-Pherogramm ausgeschnitten, eluiert und in Lösungsmittel H rechromatographiert. Durch langes Laufenlassen (über 60 Stunden) erreichten wir eine Auftrennung und identifizierten als Bestandteile des "Blocks" Serin, Glycin und Threonin. Der Valinfleck wurde aus obigem Chromatogramm eluiert und in Lösungsmittel B rechromatographiert. Hier hat Valin einen R_F -Wert von 0,11 und Methionin einen von 0,18, die Trennung gelingt also gut. Auf diese Weise war es möglich, die Abwesenheit von Methionin zu beweisen.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Resultat: die Aminosäurezusammensetzung aller vier Banden ist qualitativ weitgehend gleich. Die Banden enthalten: Lysin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Serin, Threonin, Glycin, Valin, Leucin, schwach Tyrosin sowie Bande I Histidin. Nicht gefunden wurden: Prolin, Hydroxyprolin, Phenylalanin, Methionin, Arginin, Histidin (bis auf Bande I).

4.) Zusammenfassung

Die Reaktion von Aminosäuren und deren Derivaten mit Diazoniumsalzen wurde untersucht. Dabei ergab sich, daß unter den angewandten Kupplungsbedingungen Tyrosin, Histidin, Lysin, Tryptophan, die SH-Gruppe und Prolin reagieren. Prolin ist im Eiweißverband gebunden, die SH-Gruppen lassen sich mittels PClMS schützen. Es wurden Spektren

der entstehenden Farbstoffe aufgenommen, sowie zum Teil die Farbstoffe selbst isoliert.

Versuche an Ribonuklease sollten die Reaktion an einem Enzym bekannter Struktur erproben. Es wurden Hemmkurven gemessen, sowie mittels verschiedener Analyseverfahren die Anzahl der gekuppelten Aminosäuren ermittelt.

Die Reaktion mit LDH aus Schweineherz diente der Gewinnung markierter Bruchstücke des aktiven Zentrums. Zunächst wurden mit nicht markiertem Reagenz Hemmversuche zur Ermittlung günstiger Reaktionsbedingungen unternommen, sowie die Schutzwirkung des PClMS für die SH-Gruppen untersucht. Dann wurden mit Hilfe radioaktiv markierter diazotierter Sulfanilsäure nach tryptischer Verdauung vier markierte Spaltstücke isoliert und gereinigt, deren Brutto-Aminosäurezusammensetzung ermittelt wurde.

C. Experimenteller Teil

(Material und Methoden)

I. Zur Reaktion mit Aminosäuren

1.) Darstellung der Diazoniumsalze

Diazotiertes p-Nitranilin: 6,9 g p-Nitranilin werden in 35 ml Alkohol heiß gelöst und 6 ml konz. HCl zugegeben. Nach Abkühlen der Lösung wird das Hydrochlorid mit Äther gefällt. 1,4 g p-Nitranilin-Hydrochlorid werden dann in 5 ml Eisessig suspendiert und unter Rühren 1,4 ml Isoamylnitrit zugegeben. Nach 90 Minuten wird mit Äther ein orangefarbenes Öl gefällt, das beim Anreiben erstarrt. Der Kristallbrei wird in der Lösung mit dem Spatel zerdrückt und solange mit Äther gewaschen (Äther abdekantieren), bis die Kristalle fast rein weiß und der Äther ungefärbt bleibt. Hält sich unter absolutem Äther in der Kühltruhe monatelang.

Diazotierte Sulfanilsäure: Vorschrift nach Merck's Handbuch der Chromatographie ⁶⁹⁾.

Diazotierte Arsanilsäure: 2,18 g Arsanilsäure werden in 10 ml Alkohol heiß gelöst und 2 ml konz. HCl zugegeben. Das Hydrochlorid fällt auf Ätherzusatz sehr rein aus. 2,036 g Hydrochlorid werden in einem Gemisch von 8 Teilen Eisessig und 2 Teilen Wasser suspendiert und 1,4 ml Isoamylnitrit zugegeben. Das Diazoniumsalz wird mit Alkohol/Äther gefällt und wie oben gereinigt.

Die Probe auf geglückte Diazotierung war die Reaktion mit β -Naphtol in NaOH. Diazotierte Sulfanilsäure und diazotierte Arsanilsäure ergeben rote, wasserlösliche Farbstoffe, diazotiertes p-Nitranilin wasserunlösliche rote Flocken, die auf Alkoholzusatz blauviolett in Lösung gehen.

2.) Spektren: Bei Versuchen mit überschüssigem Aminosäurederivat wurde die Reaktion von 3×10^{-6} Mol mit 3×10^{-7} Mol Diazoniumsalz in 3 ml $\frac{m}{5}$ Phosphat p_H 7,8 im Beckman DU-Spektrophotometer gemessen. Bei Überschuß Diazoniumsalz waren in der Cuvette 6×10^{-7} Mol diazotiertes p-Nitranilin bzw. 10^{-7} Mol Aminosäurederivat vorhanden.

3.) Darstellung der Farbstoffe

Monoazo-N-Chloracetyltyrosin des diazotierten p-Nitranilins: 50 ml einer 0,06 m Lösung von diazotierten p-Nitranilin wurden während einer Zeit von 30 Minuten unter Rühren zu einer Lösung von 3 mM Chloracetyl-Tyrosin in 25 ml 0,01 m Boratpuffer p_H 9 gegeben, die Reaktionstemperatur lag bei 0° C. Der p_H wurde zwischen 8,5 - 9,5 gehalten (2n NaOH). Nach 3 Stunden bei 0° wurde langsam mit 2 n HCl auf p_H 2 angesäuert, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Der orangefarbene Farbstoff wurde nach wiederholtem Umfällen aus alkalischer Lösung schließlich aus Alkohol/Petroläther ($30 - 80^\circ$) umkristallisiert und war chromatographisch rein.

Bisazo-N-Chloracetyltyrosin des diazotierten p-Nitranilins

Der Farbstoff wurde nach genau der gleichen Vorschrift (bis auf die 2,3fache Menge diazotiertes p-Nitranilin, die verwandt wurde) herzustellen versucht. Dabei resultierte ein braunes Pulver, das noch große Mengen Monoazofarbstoff enthielt. Geringe Mengen wurden chromatographisch gereinigt (Lösungsmittel B) und das Spektrum bestimmt.

Bisazo- ξ -Aminocaprinsäure des diazotierten p-Nitranilins

50 ml einer 0,08 m Lösung von diazotierten p-Nitranilin wurden während 30 Minuten zu einer Lösung von 2 mM ξ -Aminocaprinsäure in 20 ml 0,02 m Sodalösung gegeben, deren

p_H nach Lösen der Aminosäure auf p_H 10-10,5 eingestellt worden war. Der p_H wurde während der Zugabe mit 2 n NaOH auf 10-11 gehalten. Es fiel ein gelber Niederschlag aus. Nach 3 Stunden bei 0° wurde auf p_H 2 angesäuert (2 n HCl) und der Niederschlag abfiltriert und gewaschen. Er wurde getrocknet, dann zermörsert und wieder gewaschen, indem er in Wasser suspendiert 16 Stunden dauernd gerührt wurde. Er war nach dem Absaugen ebenfalls chromatographisch rein.

Histidinfarbstoffe

Acetylhistidin (nach BERGMANN und ZERVAS) 72)

2 g L-Histidin werden mit 10 ml wasserfreier Essigsäure und 10 ml frisch destilliertem reinem Essigsäureanhydrid 2 Stunden unter Feuchtigkeitsausschuß auf dem siedenden Wasserbad erwärmt, dann in der Kälte mit Wasser verdünnt, dieses bei 12 mm Druck verdampft und diese Prozedur noch dreimal wiederholt unter Zusatz von je 10 ml Wasser. Der kaum gefärbte kristalline Rückstand wird in 10 ml Wasser heiß gelöst und durch Zusatz von 25 ml Aceton das Acetylhistidin in Form schöner, schräg abgeschnittener Prismen abgeschieden. 1 Mol Kristallwasser nach Umkristallisieren aus wenig heißem Wasser. Smp 169°. Es darf kein Überschuß an Essigsäureanhydrid verwandt werden, da sonst Bildung des Azlaktone eintritt. Elektrophorese bei p_H 6,5 zeigte kein Histidin und minimale Spuren einer unbekannten Begleitsubstanz (Identifizierung mit Pauly's Reagenz).

"Monoazo-Acetylhistidin"

10 mM Acetylhistidin wurden in 25 ml Boratpuffer p_H 9,25 gelöst und der p_H auf 9 nachgestellt. Dann wurden 2 mM Diazoniumsalz in 10 ml Wasser gelöst und während 30 Minuten unter Rühren zutropfen gelassen. Der p_H wurde mittels 0,5 n NaOH bei 9-10 gehalten. Nach 3 Stunden bei 0° wurde unter Äther mit 0,5 n HCl gefällt und rasch abgesaugt. Der

ausfallende Niederschlag war zuerst ziegelrot, färbte sich jedoch während der Aufarbeitung rasch braun. Er konnte wegen fortdauernder Umwandlungen auch chromatographisch nicht gereinigt werden. Das Spektrum stützt sich daher nur auf die Messungen in Lösung.

Bisazo-Acetylhistidin

1 mM Acetylhistidin wurden in 25 ml Boratpuffer p_H 9,25 gelöst und der p_H nachgestellt. Dann wurden 2 mM Diazoniumsalz in 10 ml Wasser gelöst und während 30 Minuten unter Rühren zutropfen gelassen. Der p_H wurde mittels 0,5 n NaOH bei 9-10 gehalten. Nach 3 Stunden bei 0° wurde mit 0,5 n HCl gefällt. Der ausfallende Niederschlag hatte braune Farbe, er enthielt etwa 20 % an Verunreinigungen, die chromatographisch abgetrennt wurden (Lösungsmittel B).

Farbstoff der Indolylessigsäure mit diazotiertem p-Nitranilin

2 mM K-Indolyacetat wurden in 10 ml $m/5$ Phosphatpuffer p_H 7,8 gelöst, 2 mM Diazoniumsalz wurden unter schnellem Rühren in der Kälte zugegeben. Zuerst, beim Einwerfen geringer Mengen Diazoniumsalz, taucht eine rasch wieder verschwindende intensive Rotfärbung auf, bei weiterer Zufuhr des Reagenz fällt schließlich ein eigelber Niederschlag. Nach halbstündigem Rühren wurde abfiltriert, aus dem Filtrat fiel auf Säurezusatz nichts mehr aus. Der Farbstoff ergab beim Versuch des Umkristallisierens aus heißem Wasser ein rotes Harz.

p, p-Dinitro-Diazoaminobenzol

1 mM festes Diazoniumsalz (185 mg) wurden nach und nach zu 50 ml einer 0,2 m Ammonacetatlösung gegeben, nachdem vorher der Äther gut abgedampft war. Es fiel ein gelber Niederschlag, der nach 3stündigem Rühren abgesaugt wurde.

Nach Waschen durch Suspendieren in Wasser und 16stündigem Rühren konnten chromatographisch keine Verunreinigungen festgestellt werden.

4.) Zusammenfassende Tabellen

a) Maxima der Farbstoffe (Angabe in m)

	<u>dpN</u>		<u>dSf</u>	
	<u>Puffer</u>	<u>NaOH</u>	<u>Puffer</u>	<u>NaOH</u>
Monoazo-N-Chlor-				
ac.-Tyr.	335	345,515	325	328,490
Bisazo-N-Chlor-				
ac.-Tyr.	338	345,565	330	325,545
Monoazo-Ac.-				
His.	282,395	465	370	420
Bisazo-Ac-				
His.	525	525	-	-
Bisazo- ε -Amino-				
capronsäure	390	512	368	382
Indolylessig-				
säure-Farbstoff	400	460	-	-
Prolin-Farb-				
stoff	378	-	-	-
Diazo-Aminoben-				
zol	380	-	363	-
Resorcin-Farb-				
stoff	450	-	430	-

b) R_F -Werte der Farbstoffe der Hauptkuppler

1. Farbstoffe mit diazotierten p-Nitranilin (Lösungsmittel B)

"Monoazo-Acetylhistidin", Hauptfleck: $R_F = 0,33$
 Nebenflecke: $R_F = 0,18; 0,22;$
 (Verunreinigungen) $0,44; 0,5;$
 $0,93$

Bisazo-Acetylhistidin: $R_F = 0,60$

Monoazo-N-Chloracetyltyrosin: $R_F = 0,75$

Bisazo-~~ε~~-Aminocapronsäure: $R_F = 0,96$

2. Farbstoffe mit diazotierter Sulfanilsäure (aus wässriger Lösung chromatographiert)

Lösungsmittel Propanol/Ammoniak

"Monoazo-Acetylhistidin": R_F -Werte der Farbstoffe: 0,64;
0,57; 0,45; 0,24; 0,12

Monoazo-N-Chloracetyltyrosin: Hauptfleck R_F = 0,61

Verunreinigung R_F = 0,49

Bisazo- ϵ -Aminocaprinsäure: Hauptfleck: R_F = 0,73

Verunreinigung R_F = 0,66

(sehr schwach)

Lösungsmittel Äthanol/Wasser/Essigsäure (aus wässriger Lösung chromatographiert)

"Monoazo-Acetylhistidin": R_F -Werte der Farbstoffe: 0,37;
0,62; 0,68; 0,75; 0,84

Monoazo-N-Chloracetyltyrosin: R_F = 0,91

Verunreinigung R_F = 0,77; 0,66

Bisazo- ϵ -Aminocaprinsäure: R_F = 0,70

Verunreinigung: R_F = 0,89

c) Lösungsmittelgemische für die Chromatographie und Puffer für Elektrophorese

1. Für Farbstoffe des diazotierten p-Nitranilins:

Lösungsmittel G

600 ml Methyl-Äthyl-Keton

60 ml Aceton

100 ml Wasser

Lösungsmittel B

900 ml Methyl-Äthyl-Keton

45 ml Methyl-Glykol

210 ml Wasser

2. Für Farbstoffe der diazotierten Sulfanilsäure

a) Äthanol 500 ml

Wasser 500 ml

Eisessig 3 ml

- b) Propanol 500 ml
2 m Ammoniak 500 ml

3. Für Aminosäuren

Lösungsmittel H 750 ml sek. Butanol
150 ml Ameisensäure
100 ml Wasser

Puffer p_H 6,5: 4450 ml Wasser
(Elektrophorese) 500 ml Pyridin
50 ml Eisessig

5.) Kupplung und Hydrolyse von Insulin B-Kette

17,5 mg (5 μ M) Insulin B-Kette wurden in 5 ml $m/20$ Soda-
lösung gelöst und mit 20fachem Überschuß an diazotierter
Sulfanilsäure 1 Stunde lang in der Kälte gekuppelt. Nach
Ablauf dieser Zeit wurde mit 50 ml Aceton ein Gemisch von
gekuppelter B-Kette und Salzen ausgefällt, abzentrifu-
giert und drei- bis viermal mit Aceton und wasserhaltigem
Äther gewaschen. Sodann wurde mit 6 n HCl 18 Stunden bei
110° C hydrolysiert und bei p_H 6,5 elektrophoriert. Um
den Störungseffekt der Salze bei der Chromatographie aus-
zuschalten, wurde nach einem dem "Fingerprint" ähnlichen
Verfahren zunächst bei p_H 6,5 2 Stunden elektrophoriert
(wobei die Salze sowie saure und basische Aminosäuren
auswanderten) und dann senkrecht zur Elektrophoreserich-
tung 24 Stunden in Lösungsmittel H chromatographiert.

Zur Reaktion mit Proteinen

1.) Ribonukleasetest (n. ROGERS und KALNITSKY) 73)

4 ml 0,2 m auf genau p_H 5,0 eingestellten Acetatpuffers,
die 1-5% Ribonuklease enthielten, wurden genau 10 Minuten
bei 30° mit 1 ml 1prozentiger Ribonukleinsäurelösung in-
kubiert (Heferibonukleinsäure von Schuchardt, reinst. Die
Lösung wurde auf p_H 5,0 eingestellt). Die Reaktion wurde

durch Zugabe von 1 ml McFadyen's Reagenz (0,75 % Uranylacetat in 25prozentiger HClO_4) beendet. Der Niederschlag wird nochmals aufgerührt und dann abzentrifugiert. 0,1 ml des Überstandes wurden mit 3,0 ml destilliertem Wasser versetzt und die optische Dichte bei 260 m μ im Zeiß-Opton bestimmt. Einheiten: 45 Kunitzeinheiten = 1 mg Ribonuklease.

2.) Histidinbestimmung (n. NEWMAN und TURNBULL) 74)

Materialien:

1. Trockenes Pyridin (über P_2O_5 destillieren)
Kp 115°
2. KJ-Lösung: 0,075 g Jod + 0,4 g KJ in
10 ml Wasser
3. 0,02 m Natriumdithionit-Lösung

Methode: 3 ml der Testlösung mit 2-55 γ Histidin werden in ein bei 5 ml markiertes Schliffreagenzglas gegeben, dann werden 1,2 ml Pyridin zugegeben und das Gemisch mit 1-2 Tropfen NaOH auf pH 11-12 gebracht. Dann wurden genau 0,04 ml KJ_3 Lösung zupipettiert, sofort umgeschüttelt und nach 30 sec, gerechnet vom Umschütteln an, 0,5 ml Dithionitlösung zugegeben und wieder umgeschüttelt. Dann wird auf genau 5 ml aufgefüllt. Nach genau 5 Minuten wird die Extinktion gegen einen Blindwert, der gleichzeitig der gleichen Prozedur unterworfen wurde, gemessen. (560 m μ)

3.) Modifiziertes Biuretverfahren zur Azoproteinbestimmung

Das Azoprotein wird mit 49prozentiger Trichloressigsäure (1/6 der Lösung) ausgefällt und abzentrifugiert. Dann wird mit 5 ml Wasser und 5 ml Biuretreagenz versetzt und bis zur völligen Auflösung des Azoproteins umgeschüttelt. Ein Blindwert wird ebenso angesetzt. Es wird nun noch ein zu-

sätzlicher Blindwert angesetzt, der dazu dient, die Eigenfärbung des Azoproteins in alkalischer Lösung zu kompensieren. Dazu wird die gleiche Prozedur wie eingangs mit der gleichen Menge Azoproteinlösung vorgenommen, nur wird diesmal anstelle des normalen mit einem Biuretreagensatz versetzt, das alle Substanzen außer CuSO_4 enthält. Es werden die drei Extinktionen bei $546 \text{ m}\mu$ im Photometer Eppendorf gemessen und die beiden Blindwerte vom Hauptwert abgezogen. Da nun die Eigenextinktion der Cuvette in den Blindwerten 2mal abgezogen, in Hauptwert aber nur einmal enthalten ist, muß diese ebenfalls gemessen und nach Subtraktion der Blindwerte wieder addiert werden. Der erhaltene Endwert wird behandelt wie eine bei der normalen Biuretbestimmung erhaltene Endextinktion.

Berechnungsbeispiel:

0,214 Extinktion des Azoproteins in normalem Biuretreagensatz

-0,101 Extinktion des Azoproteins in Biuretreagensatz ohne CuSO_4

-0,123 Extinktion des normalen Biuretblindwerts

-0,010

+0,048 Extinktion der Cuvette mit Wasser

+0,038

$$0,038 \times \frac{1}{0,5} \times 16,5 = 1,25 \text{ mg/ml}$$

$\uparrow$ $\nwarrow$
 (Verdünnung) (E-Koeffizient für Proteine)

4.) Verfahren von BOYER zur SH-Gruppenbestimmung ⁷⁵⁾

Die LDH wurde gegen $\frac{\text{m}}{15}$ Phosphatpuffer pH 7,2 dialysiert. 1,5 ml der LDH-Lösung mit etwa 2 mg Eiweiß wurden in eine Quarzcuvette gegeben und mit 1,4 ml 8M Harnstofflösung versetzt, um das Protein zu entfalten. Dann wurde 0,1 ml einer PCLMB-Lösung zugesetzt, die auf folgende Weise bereitet war: 17,9 mg ($50 \mu\text{M}$) PCLMB wurden in 1 ml 0,2 N NaOH gelöst und mit Phosphatpuffer auf 10 ml verdünnt.

Dann wurden folgende Extinktionen gemessen:

Schema der Messungen:

<u>Messung 1</u>		<u>Messung 2</u>	
H: Cuvette mit	B: Cuvette	H: Cuvette mit	B: Cuvette
PClMB	mit Puf-	Harnstoff	mit Puf-
LDH	fer	LDH	fer
Harnstoff		Puffer	
Puffer			
(-SHg-)			

<u>Messung 3</u>	
H: Cuvette mit	B: Cuvette
PClMB	mit Harnstoff und
Harnstoff	Puffer
Puffer	

Dabei eliminiert der Blindwert im Hauptwert jeweils die durchstrichenen Substanzen. Die gesuchte Extinktion ergibt sich durch Subtraktion der Extinktionen 2 und 3 von der Extinktion 1.

1	-	2	-	3	=ΔE für -S-Hg-
PClMB		Harnstoff		PClMB	
Harnstoff		LDH			
LDH					
(-SHg-)					

5.) Kupplung der LDH nach Schutz mit PClMS

Zunächst wird aus der Ammonsulfatsuspension der LDH eine entsprechende Menge entnommen (Biuret) und über Nacht 2mal gegen $\frac{m}{10}$ Pyrophosphatpuffer p_H 8,6 dialysiert. Da beim Öffnen des Dialyseschlauchs immer Eiweiß verloren geht, man aber zur Berechnung der zuzusetzenden Reagenzmengen eine Angabe über die noch vorhandene Proteinmenge unbedingt braucht, muß die Flüssigkeitsmenge gemessen und erneut eine Biuretbestimmung gemacht werden. (Verdünnung durch Dialyse!). Die vorhandene Menge LDH wird in Mol berechnet, außerdem wird die Anfangsaktivität getestet.

Nachdem die zuzusetzenden Reagenzmengen berechnet sind, wird zunächst ein 20facher molarer Überschuß an PCLMS zugegeben und eine Stunde einwirken gelassen. Dann wird getestet. Ist die Aktivität nahezu vollständig verschwunden (unter 1 %) so wird ein zehnfacher molarer Überschuß an diazotierter Sulfanilsäure zugegeben und eine halbe Stunde einwirken gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wird ein 25facher molarer Überschuß an Resorcin zugegeben, um restliche diazotierte Sulfanilsäure zu zerstören und dann möglichst rasch ein 2000facher (in Bezug auf das PCLMS 100facher) Überschuß an KCN. Die KCN-Lösung wird vor der Zugabe rasch mit KH_2PO_4 auf etwa pH 8,6 eingestellt. Nach der KCN-Zugabe wird nochmals getestet, um die Restaktivität zu bestimmen. Nun wird 3-4 Tage unter ständigem Wechseln des Puffers gegen 0,2 m NaCl pH 7-7,5; zuletzt gegen bidest. H_2O dialysiert (zunächst im Abzug), sodann wird gefriergetrocknet.

6.) Proteolytischer Abbau mit Trypsin

Das Azoprotein wurde in 20 ml $\frac{\text{M}}{20}$ NH_4HCO_3 -Puffer pH 7,8 in einem kleinen Schliff-Rundkölbchen suspendiert und Trypsin im Verhältnis 5:1 (Azoprotein:Trypsin) zugegeben. Um eine gute Durchmischung der Lösung zu gewährleisten, wurden einige kleine Glaskugeln zugefügt, zum Schluß wurden einige Tropfen Toluol zupipettiert, um den Ansatz vor bakterieller Zersetzung zu schützen. Dann wurde 48 Stunden bei 37° geschüttelt, wobei eine gelbe klare Lösung entstand. Nach Beendigung des Abbaus wurde 15 Minuten auf 100° (siedendes Wasserbad) erhitzt, das ausfallende Trypsin zusammen mit etwa nicht verdaulichem Azoprotein abzentrifugiert und der Überstand mehrere Male sorgfältig filtriert, wobei der Filter vorher mehrmals mit bidest. Wasser vorgewaschen war. Die Lösung wurde gefriergetrocknet und das resultierende Peptidgemisch der Elektrophorese unterworfen (s.oben).

7.) Radioaktivitäts-Messungen

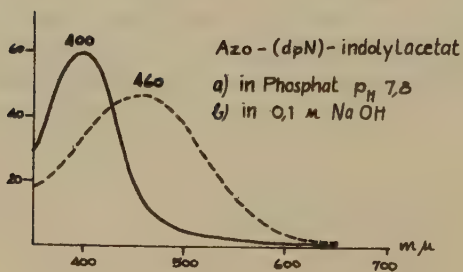
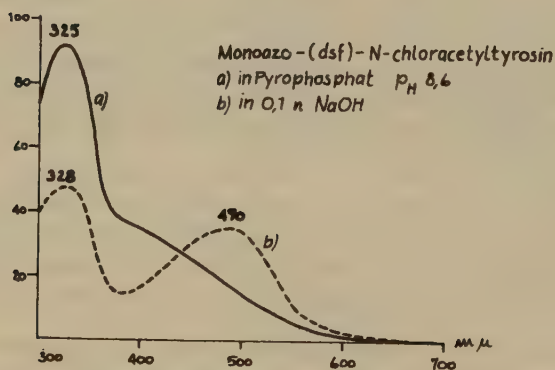
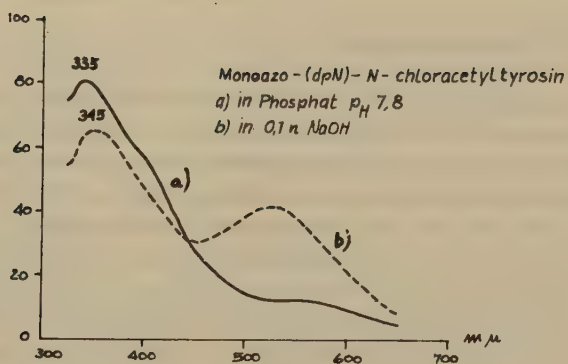
Die verwendete Sulfanilsäure wurde vom Radiochemical Centre London bezogen und im hiesigen Institut von Herrn Dr. Gruber diazotiert. Ihre spezifische Radioaktivität betrug 75,3 mC/g. Die Kupplung mit LDH wurde genau wie die mit normaler diazotierter Sulfanilsäure durchgeführt, allerdings dürfen die ersten Dialysewässer infolge der starken Strahlung nicht weggegossen werden.

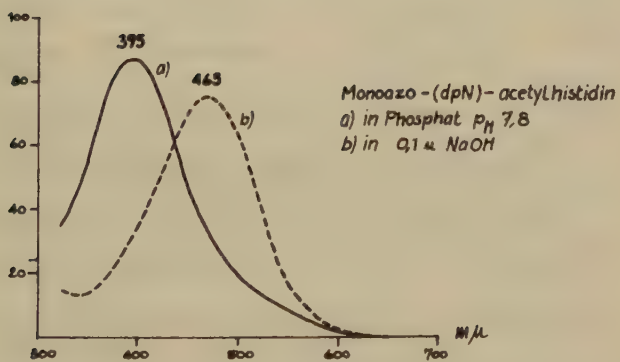
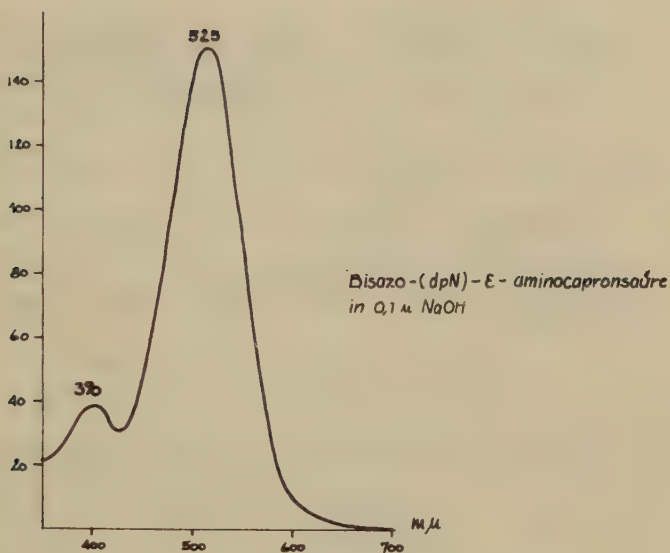
Zur Messung der Einbaurate wurden 2-3 mg markiertes Azoprotein eingewogen und mit $\frac{m}{50}$ NaOH auf eine Konzentration von 1 mg pro ml gebracht. Diese Lösung wurde mit Wasser 1:10 verdünnt, so daß die Konzentration an Azoprotein 0,1 mg/ml betrug. Von dieser Lösung wurden je 0,02; 0,04 bzw. 0,08 ml auf 3 Aluminium-Zählschälchen gegeben, die am Rande mit Schälffett eingerieben waren, um ein Hochkriechen der Flüssigkeit zu vermeiden. Die Flüssigkeit wurde mit dem Mikrospatel möglichst gleichmäßig verteilt, abgedampft und die Impulszahlen im 2 π -Zähler bestimmt. Nach Abzug des Tages-Blindwerts wurde der Mittelwert bestimmt und durch Vergleich mit der spezifischen Aktivität die Einbaurate errechnet. Die spezifische Aktivität wurde trotz Angabe vom RC auf ähnliche Weise nochmals gemessen und ein etwas höherer Wert als der angegebene ermittelt.

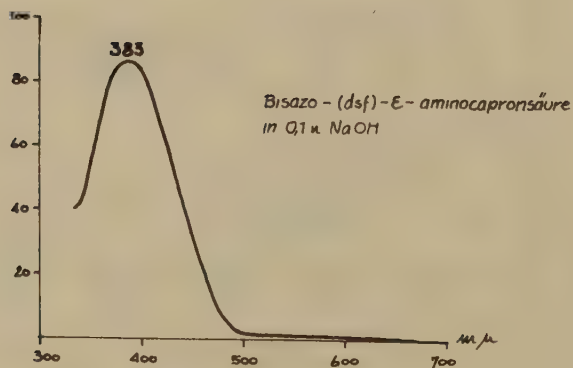
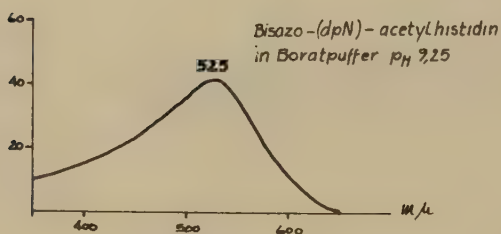
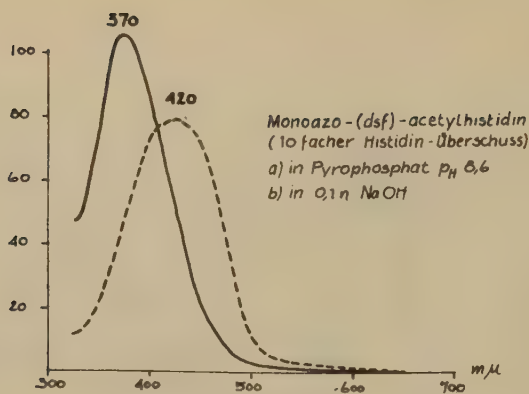
Zur Messung der Impulsverteilung auf dem Einstunden-Pherogramm nach der Trypsinverdauung des Azoproteins wurden jeweils flächengleiche Papierstücke aus den einzelnen Peptidbanden ausgeschnitten und durch Auflegen auf ein Zählschälchen und Messung im 2 π -Zähler die Aktivitäten bestimmt. Nach Möglichkeit wurden auch Zwischenwerte gemessen (s. Kurve).

8.) Autoradiographie

Das jeweilige Phero-bzw. Chromatogramm wurde unter Rotlicht mit der strahlenden Seite auf einen Röntgenfilm aufgelegt und mit Büroklammern befestigt. Um die spätere Auffindung der Banden zu erleichtern, wurden charakteristische Muster aus den Rändern ausgeschnitten. Der Film wurde in zwei Lagen schwarzes Papier eingepackt und in einer Presse 2-3 Tage unter leichtem Druck aufbewahrt (die günstigste Belichtungszeit wurde nach Angaben des biochemischen Taschenbuchs errechnet). Nach 2 Tagen wurde mittels Spezialreagentien der Firma Schleußner im Dunkeln entwickelt und fixiert, der Film gut gewässert, getrocknet und nach Maßgabe der ausgeschnittenen Muster auf das Phero-bzw. Chromatogramm aufgelegt. Die Identifikation der Banden erfolgte durch Durchstechen mit einer Nadel; eluiert wurde mit schwach NH_4HCO_3 -haltigem Wasser.







Literaturverzeichnis

- 1.) Sanger, F. Tuppy, H. Bioch. J. 49/463, 481 (1951)
Thompson, E.O.P. 53/353, 366 (1953)
- 2.) Hirs, C.H.W., Moore, S. J.B.C. 235/633 (1960)
Stein, W.H.
- 3.) Jollès, P. Jollès-Thaureaux, J. Fromageot, .B.B.A. 27/
439, (1958)
- 4.) Hill, R.L. Smith, E.L. J.B.C. 231/117 (1958)
- 5.) Harris, J.I., Knight, C.A. J.B.C. 214/215, 231 (1955)
- 6.) Peters, T., Logan, H.C., Sanford, C.A. B.B.A. 30/88
(1958)
- 7.) nach Th. Wieland, Angew. Chemie 71/417 (1959)
- 8.) nach H. Tuppy, Naturwiss.46/35 (1959)
- 9.) Goldstein, J. Guidotti, G. Konigsberg, W. Hill, R.J.
J.B.C. 236/ PC 77 (1961)
- 10.) Ambler, R.P. Bioch. J. 82/30 P (1962)
- 11.) Anfinsen, C.B. J.B.C. 221/405 (1956)
- 12.) Richards, F.M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44/162
(1958)
- 13.) Dixon, M. Webb, E.C. The Enzymes S. 492 (1959)
- 14.) Koshland, D.E. Advances in Enzymology 22/ 45 (1960)
- 15.) Nylander, O., Malmström, B.G. Bioch. Bioph. Acta 34/196
(1959)
- 16.) Kaplan, N.O., Ciotti, M.M., Stolzenbach, F.E. J.B.C.
221/833 (1956)
- 17.) Franzen, V. Chem.Ber. 88/1361 (1955) 89/1020 (1956)
- 18.) Rupley, J.A., Neurath, H. J.B.C. 235/609 (1960)
- 19.) Vallee, B.L., Coombs, Th.L., Hoch, F.L. J.B.C. 235/
P.C. 45 (1960)
- 20.) Tanford, Ch., Hauenstein, J.D., Rands, D.G. J.A.C.S.
77/6409 (1955)
- 21.) Tanford, Ch., Hauenstein, J.D., Rands, D.G. J.A.C.S. 78/
5287 (1956)

- 22.) Putnam, F.W., The Proteins Vol. I S. 894 (1953)
- 23.) Herriott, R.M. Advances in Protein Chemistry 3/169 (1947)
- 24.) Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbäck, K. The Enzymes Vol. I S. 589 (1959)
- 25.) Olcott, H.S., Fraenkel-Conrat, H., Chemical Reviews 41/151 (1947)
- 26.) Braunitzer, G. Angew. Chemie 69/189 (1957)
- 27.) Viswanatha, T., Lawson, W.B. Archives B.B. 93/128 (1961)
- 28.) Viswanatha, T., Lawson, W.B., Witkop, B. B.B.A. 40/216 (1960)
- 29.) Ray, D.E., Koshland, D.E. J.B.C. 236/1973 (1961)
- 30.) Milstein, C., Sanger, F. Bioch. J. 79/456 (1961)
- 31.) Fischer, E.H., Graves, D.J., Snyder-Crittenden, E.R., Krebs, E.G. J.B.C. 234/1698 (1959)
- 32.) Schöberl, A., Angew. Chemie 70/646 (1958)
- 33.) Boyer, P.D. etc. The Enzymes (Boyer, Lardy, Myrbäck (s.24)) Vol I S. 511
- 34.) Gundlach, H.G., Stein, W.H., Moore, S. J.B.C. 234/1754 (1959)
- 35.) Gundlach, H.G., Stein, W.H., Moore, S. J.B.C. 234/1761 (1959)
- 36.) Kubo, S., Tokura, S., Tonomura, Y. J.B.C. 235/2835 (1960)
- 37.) Kitagawa, S., Yoshimura, J., Tonomura, Y. J.B.C. 236/902 (1961)
- 38.) Dobry-Duclaux, A., Daumas, N. B.B.A. 39/33 (1960)
- 39.) Dobry-Duclaux, A., Daumas, N. B.B.A. 39/44 (1960)
- 40.) Witter, A., Tuppy, H. B.B.A. 45/429 (1960)
- 41.) Hartley, B.S., Massey, V. B.B.A. 21/58 (1956)
- 42.) Wold, F. J.B.C. 236/106 (1961)
- 43.) Zahn, H., Zuber, H. Ber. 86/172 (1953)
- 44.) Haurowitz, F., Sewinski, R., Hsin Fu Cheng, J.A.C.S. 79/1882 (1957)

- 45.) Sela, M., Katchalsky, E. J.A.C.S. 77/3662 (1955)
- 46.) Westfal, O. Naturwis. 46/50 (1959)
- 47.) Fraenkel, Conrat, H., Bean, R.S., Lineweaver, H.
J.B.C. 177/385 (1949)
- 48.) Tabachnik, M., Sobotka, H. J.B.C. 235/1051 (1960)
- 49.) Luisada-Opper, A.V., Sobotka, H., Chanley, J.D. J.B.C
236/2250 (1961)
- 50.) Pauly, H.Z. Z.physiol.chem. 42/508 (1904)
- 51.) Pauly, H.Z. Z.physiol.chem. 94/284 (1915)
- 52.) Eagle, H., Vickers, C. J.B.C. 114/193 (1936)
- 53.) Busch, M., Patranascu, N., Weber, W. J.prakt.Chem. 140/
117 (1934)
- 54.) Zahn, H., Wollemann, B., Waschka, O. Z.physiol.chem.
294/100 (1954)
- 55.) Howard, A.N., Wild, F. Bloch. J. 65/651 (1957)
- 56.) Higgins, H.G., Harrington, K.J. Archives B.B. 85/403
(1959)
- 57.) Higgins, H.G., Fraser, D., Nature 172/459 (1953)
- 58.) Higgins, H.G., Fraser, D. Austr.J. of Scientif. Research
5/736 (1952)
- 59.) Tabachnik, N., Sobotka, H. J.B.C. 234/1726 (1959)
- 60.) Houben/Weyl, Bd. IV S. 808
- 61.) Bucherer, Th., Wolff, S. Ber. 42/881 (1909)
- 62.) Sluyterman, L.A. B.B.A. 38/218 (1960)
- 63.) Beilstein, Bd. XVI S. 483 (s.a. Ergänzungswerke)
- 64.) Beaven, G.H., Holiday, E.R. Advances in Protein Chemistry
7/369 ff. (1952)
- 65.) Fritz, E.R., Zahn, H. Z.anal.chem. 162/414 (1958)
- 66.) Tsanev, R., Markov, G. B.B.A. 42/442 (1961)
- 67.) Cha, Ch.Y., Scheraga, H. Research C.Vol. 5/67 (1961)

- 68.) Wieland, Th., Pfeleiderer, G., Jeckel, D. Archives B.B. 83/275 (1959)
- 69.) Merck/Darmstadt: Anfärbereagenzien f. die Papierchromatographie S. 12 (Reagenz No. 47)
- 70.) Gelewitz, E.W., Riedeman, W.L., Klotz, J.M. Archives B.B. 53/411 (1954)
- 71.) Szabolcsi, G., Biszka, E. B.B.A. 48/335 (1961)
- 72.) Bergmann, M., Zervas, H. Bio.Z. 203/280 (1928)
- 73.) Rogers, W.O., Kalnitsky, G. B.B.A. 23/525 (1957)
- 74.) Newman, P.N., Turnbull, J.H. Bioch.J. 74/379 (1960)
- 75.) Boyer, P.D., J.A.C.S. 76/4331 (1954)

Lebenslauf

Am 23.6.1935 wurde ich als Sohn des Pfarrers Werner Veerhoff und seiner Ehefrau Irmgard geb. Selbach in Wuppertal-Barmen geboren. Von Herbst 1941 bis Ostern 1946 besuchte ich die Volksschule in Lengerich/Westf., von 1949 bis Ostern 1948 die dortige Mittelschule und bis November 1952 die Staatl. Graf-Adolf (Aufbau-) Schule in Tecklenburg/Westf. Die Reifeprüfung bestand ich (nachdem meine Eltern inzwischen ihren Wohnsitz geändert hatten) in Recklinghausen an der dortigen Freiherr-vom-Stein-Schule, ebenfalls einer Aufbauschule.

Mein Studium begann ich im W.S. 1954/55 an der Universität Heidelberg; an der ich am 1.2.1957 das Diplomchemiker-Vorexamen ablegte. Ab W.S. 1957/58 studierte ich an der Universität Frankfurt/Main weiter, da inzwischen mein Vater gestorben und meine Mutter ihren Wohnsitz nach Weilburg/Lahn verlegt hatte. In Frankfurt bestand ich am 1.6.1959 das Diplomchemiker-Hauptexamen. Anschließend führte ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr.G. Pfeleiderer meine Diplomarbeit über das Thema "Strukturuntersuchungen an Lactatdehydrogenasen" aus, die im September 1960 abgeschlossen wurde. Darauf begann ich, ebenfalls unter Anleitung von Herrn Professor Dr.G.Pfeleiderer, meine Doktorarbeit über das Thema "Die Reaktion von Diazoniumsalzen mit Aminosäuren und Proteinen", die ich im März 1962 beendete.

